

**Untersuchungen zum Adhäsions- und Migrationsverhalten  
eukaryotischer Zellen auf künstlichen Substraten**

**D i s s e r t a t i o n**

**zur Erlangung des akademischen Grades**

**d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**

**(Dr. rer. nat.)**

**im Fach Biophysik**

**eingereicht an der**

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I**

**der Humboldt-Universität zu Berlin**

**von**

**Dipl.-Biochem. Uta S. Joos geb. Euler  
30. November 1977 Essen**

**Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Christoph Marksches**

**Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Thomas Buckhout, PhD**

**Gutachter: 1. Prof. Dr. Günter R. Fuhr  
2. Prof. Dr. Roland Glaser  
3. Prof. Dr. Volker Herzog**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2007**

## **Abstract**

Der zerstörungsfreien Charakterisierung und Analyse von lebenden humanen Zellen über längere Zeiträume kommt zukünftig in Medizin und Biotechnologie eine zentrale Rolle zu. Für eine therapeutische Nutzung müssen die Zellen nach der Analyse unverändert und vital vorliegen.

Ein Ansatz beruht auf der Analyse von nanoskopischen Zellrückständen, die von Zellen während der Migration hinterlassen werden, den Zellspuren. Diese spiegeln in repräsentativer Weise die Merkmale der Erzeugerzelle wider. Für die technische Nutzung muss der Entstehungsprozess reproduzierbar kontrolliert werden können.

Im Zusammenhang wurde ein Versuchsaufbau zur Beobachtung der dynamischen Prozesse Adhäsion, Migration und substratnahe Organisation des Zytoskeletts von lebenden Zellen entwickelt, der hochauflösende Langzeitbeobachtungen mittels Totaler Interner Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie ermöglicht. Zur Auswertung wurde eine auf Falschfarben beruhende Darstellungsweise der dynamischen Prozesse entwickelt.

Es konnte eine Korrelation der Eigenschaften der Zellspuren mit dem Adhäsions- und Migrationsverhalten, sowie dem Aufbau der substratnahen Bereiche des Zytoskeletts der Erzeugerzellen nachgewiesen werden. Ebenso wurde der Einfluss der oberflächenspezifischen Substrateigenschaften (Beschichtung oder topografische Strukturierung) auf die Zellspurablage gezeigt.

## **Abstract englisch**

Nondestructive characterisation and analysis of human living cells over a long period will be an important issue for medicine and biotechnology in the near future. In order to use the cells after analysis for therapeutical applications, the cells have to be unmodified and still alive after the analytical procedure.

The analysis of nanoscopic cell residues, called cell traces, which are left behind during cell migration represent an appropriate approach. Attributes of the donor cell are shown by the cell trace characteristically. In order to use cell traces for biotechnological applications the formation and deposition of cell traces has to be repeatable.

Thus, an experimental set up using Total Internal Fluorescence Microscopy (TIRF) has been established to observe the dynamic processes of cell adhesion, cell migration and the organisation of the cytoskeleton used therein. Using microcolours a new embodiment has been developed to evaluate dynamic processes.

Cell adhesion, cell migration and the organisation of the actin cytoskeleton of the donor cells have been found to influence the attributes of cell traces. Further specific modified surfaces have been used to influence the deposition of cell traces. Effects have been shown for coated surfaces or surfaces with a topographic structure.

---

# Inhaltsverzeichnis

# Seite

1	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung .....	7
3	Zellbiologischer Hintergrund .....	12
3.1	Zellmigration.....	12
3.1.1	Migrationsformen .....	12
3.1.2	Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Zellmigration .....	13
3.1.2.1	Aktinstrukturen der Zellfront .....	14
3.1.2.2	Aktinstrukturen des Zellkörpers.....	16
3.2	Zelladhäsion an Substraten .....	17
3.2.1	Integrine .....	17
3.2.2	Adhäsionsstrukturen .....	18
3.3	Ablösung des Zellendes vom Substrat.....	20
3.4	Zellspuren .....	21
3.4.1	Morphologische Beschreibung.....	21
3.4.2	Zusammensetzung von Zellspuren .....	22
3.4.3	Entstehung von Zellspuren .....	23
3.4.4	Alterungsprozess von Zellspuren.....	23
3.4.5	Zellspuren anderer Zellarten .....	24
3.5	Einfluss strukturierter Oberflächen auf Zellen .....	24
4	Methodischer Teil.....	26
4.1	Materialien.....	26
4.1.1	Chemikalien .....	26
4.1.2	Antikörper und Farbstoffe.....	26
4.1.3	Zellkultur.....	27
4.1.3.1	Zellen .....	27
4.1.3.2	Medien / Puffer .....	27
4.1.3.3	Zusätze .....	27
4.1.3.4	Transfektion .....	27
4.1.4	Labormaterialien und Laborgeräte .....	27
4.1.5	Mikroskopie .....	28
4.2	Methoden .....	29
4.2.1	Zellkultur.....	29
4.2.2	Beschichtung von Substratoberflächen.....	29
4.2.3	Fluoreszenzverfahren .....	30
4.2.3.1	Färbungen.....	30
4.2.3.2	Lebend-Fluoreszenzmarker .....	32
4.2.4	Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie.....	34
4.2.4.1	Bildaufnahme .....	37
4.2.4.2	Zeitserien .....	37
4.2.4.3	Bildverarbeitung .....	39
4.2.5	„Confocal Laser Scanning“-Mikroskopie (CLSM).....	40
4.2.6	Strukturierung von Oberflächen .....	40
4.2.6.1	Elektronenstrahl-Lithographie .....	41

---

5	Ergebnisse .....	43
5.1	Dynamik des Migrationsverhaltens .....	43
5.2	Charakterisierung der Adhäsion.....	45
5.3	Dynamik der Adhäsionsmuster .....	52
5.3.1	Darstellung von Bildserien aus Zeitrafferstudien mittels einer Farbkodierung.....	52
5.3.2	Dynamik des Adhäsionsmusters von CHO-Zellen .....	54
5.3.3	Dynamik des Adhäsionsmusters von L929-Fibroblasten .....	55
5.3.4	Dynamik der Adhäsionsmuster von C2C12-und 3T3-Zellen.....	57
5.4	Entstehung von Zellspuren .....	61
5.4.1	Beobachtung des Entstehungsprinzips und Morphologie von Zellspuren .....	61
5.4.2	Korrelation der Adhäsionsmuster mit der Morphologie der Zellspur .....	65
5.4.3	Aktindynamik während der Entstehung von Zellspuren .....	72
5.4.4	Beeinflussung der Morphologie von Zellspuren mittels einer modifizierten Oberfläche.....	73
5.5	Beeinflussung von Zelladhäsion und Zellmigration mittels strukturierter Oberflächen.....	76
5.6	Seltene Ereignisse im ventralen Aktinzytoskelett.....	79
5.6.1	Entstehung von Aktinsternen aus Aktinakkumulation bei L929-Zellen .....	79
5.6.2	Dynamik von Aktinsternen .....	83
5.6.3	Aktinakkumulationen bei C2C12-Zellen .....	85
6	Diskussion.....	87
6.1	Aufbau des TIRF-Zeitraffer-Arbeitsplatzes.....	87
6.2	Datenauswertung .....	90
6.3	Untersuchung der Adhäsionsmuster und Migrationsformen .....	90
6.3.1	Unterscheidung der Adhäsionsmuster .....	91
6.3.2	Zusammenhang zwischen Adhäsionsmustern und Migrationsverhalten .....	92
6.4	Entstehung von Zellspuren .....	94
6.4.1	Entstehung der Verzweigungen in L929-Zellen .....	94
6.4.2	Entstehung der parallelen Zellspuren in C2C12-und 3T3-Zellen .....	96
6.5	Modifikation der Substratoberfläche.....	97
6.5.1	Veränderung der Zellspurmorphologie bei beschichteten Substraten .....	98
6.5.2	Einfluss topographisch strukturierter Oberflächen .....	99
6.6	Bildung von Aktinsternen .....	101
7	Ausblick.....	104
8	Literatur .....	106
	Abkürzungsverzeichnis.....	114
	Danksagung.....	116
	Selbständigkeitserklärung.....	117
	Lebenslauf .....	117
	Publikationsliste .....	118

# 1 Zusammenfassung

Der zerstörungsfreien Charakterisierung und Analyse von lebenden humanen Zellen über ausreichend lange Zeiträume kommt bei zukünftigen zellbasierten Ansätzen in Medizin und Biotechnologie eine zentrale Rolle zu. Für eine therapeutische Nutzung müssen die Zellen nach der Analyse unverändert und vital vorliegen.

Ein viel versprechender Ansatz zur Lösung dieser Problematik beruht auf der Analyse von nanoskopischen Zellrückständen, die viele Zellen während der Migration über technischen Oberflächen hinterlassen. Bei diesen „Zellspuren“ handelt es sich um membranumhüllte schlauchartige Strukturen mit Durchmessern von ca. 120 Nanometern und Längen von mehreren hundert Mikrometern, die in repräsentativer Weise Merkmale der molekularen Membranzusammensetzung der Erzeugerzelle widerspiegeln. Um das Potential der Zellspuren biotechnologisch zu nutzen, muss deren Entstehungsprozess reproduzierbar kontrolliert werden können, insbesondere in Hinblick auf eine hochparallele und effiziente Auswertung des Informationsgehaltes der Spuren.

Im Zusammenhang mit dieser Thematik interessierten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen: Wie korrelieren die Eigenschaften der Zellspuren mit dem Adhäsions- und Migrationsverhalten, sowie dem Aufbau der substratnahen Bereiche des Zytoskeletts der Erzeugerzellen? Wie und mit welchen oberflächenspezifischen Substrateigenschaften kann die Zellspurablage beeinflusst werden? Mit welchen optischen Methoden und unter welchen Bedingungen können die dynamischen Prozesse Adhäsion, Zellmigration und die substratnahe Organisation des Zytoskeletts von lebenden Zellen über lange Zeiträume oberflächenspezifisch charakterisiert werden?

Als Ergebnis dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass die Zellspurentstehung in unmittelbarem Zusammenhang mit der Migration steht. Adhäsionspunkte, die eine Zeit lang ortsfest auf dem Substrat hafteten, bleiben als Ausgangspunkte der Zellspuren zurück. Dabei beeinflusst das Muster der Zelladhäsion essenziell die Morphologie der Zellspur und kann durch beschichtete Oberflächen gezielt verändert werden. Weiterhin konnten die Zellspurentstehung am Aktinzytoskelett sowie neue wolken- und sternförmige Aktinstrukturen beobachtet werden. Durch den Einsatz topographisch strukturierter Oberflächen, deren Strukturmerkmale Dimensionen bis in den Sub-Mikrometer-Bereich besitzen, konnte eine ortsgenaue Ablage der Zellen mit vorgegebener Orientierung sowie eine definierte Ausrichtung von Teilen des Zytoskeletts erzielt werden.

Zur Langzeit-Analyse oberflächenspezifischer Prozesse lebender Zellen mit hoher optischer Qualität wurde die Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie genutzt. Zur Auswertung wurde eine einfache, auf Falschfarben beruhende Darstellungsweise der dynamischen Prozesse entwickelt.

Die hier erzielten Ergebnisse sollten eine solide Basis für die analytische Nutzung von Zellspuren und darüber hinaus für den gezielten Einsatz von Oberflächen für die Kontrolle des Zellverhaltens darstellen.

## 2 Einleitung

In der medizinischen und biotechnologischen Forschung und Nutzung nimmt die Bedeutung der individuellen Zelle und damit deren kontaminationsarme und zerstörungsfreie Charakterisierung in steigendem Maße zu. Dies begründet sich aus dem Wunsch einer weiteren Verwendung der Zellen nach der Analyse, z. B. als Ausgangspunkt für Zellklone, die dann nach ausreichender Vermehrung für Zelltherapien der Medizin oder für das „Tissue Engineering“ verwendet werden können. Molekularbiologische Techniken wie die PCR, die Massenspektrometrie aber auch eine Vielzahl spezifischer Fluoreszenzmarkierungen erfüllen diese Forderung nicht oder nur bedingt. Der Nachteil der genannten hochauflösenden Verfahren ist, dass zur Analyse die Zelle in der Regel fixiert oder lysiert, d. h. abgetötet werden muss. Somit erhält man zwar die gewünschte Aussage, jedoch steht die Zelle für weiter führende Versuche nicht zu Verfügung.

Große Bedeutung erlangt daher die zerstörungsfreie einzelzellbasierte spezifische Bestimmung zellulärer Proteine, um Aussagen über Zellveränderungen treffen zu können. Beispiele hierfür sind die Tumorigenität von Krebszellen, der Differenzierungsgrad von Stammzellen oder die Vitalität toxisch exponierter Zellen. Verfahren zur zerstörungsfreien Einzelzellcharakterisierung sind Impedanz- und NMR-Verfahren, AFM-basierte molekulare Sondentechniken oder Sensorarrays (Artemov et al. 1999; Baumann et al. 1999; Brischwein et al. 2003; Ehret et al. 1998; Jaasma et al. 2006; Prechtel et al. 2002). Allerdings sind zur Zeit alle diese Ansätze entweder gerätetechnisch sehr aufwändig oder erfordern hochstabilisierte und standardisierte Verfahren.

Im Organismus erfolgt die Zell-Zell-Kommunikation, z. B. im Zusammenhang mit neugebildeten Zellen des Immunsystems, durch Zell-Zell-Oberflächenwechselwirkungen. Dies sollte das natürliche Vorbild für die biotechnologisch noch zu entwickelnden technischen Zellcharakterisierungssysteme sein. In einem einzigen Schritt, z. B. durch Kultivierung von Zellen auf Sensoroberflächen ist diese Aufgabe nicht zu lösen. Vielmehr handelt es sich um ein sehr komplexes Aufgabenfeld, das nur über das schrittweise Verständnis der Vorgänge der Zelladhäsion und Zell-Oberflächen-Interaktion vorangetrieben werden kann. Entsprechend handelt es sich um ein derzeit über nanotechnologische Ansätze sehr stark beforschtes Gebiet der Zellbiologie (Arnold et al. 2004; Liliensiek et al. 2006).

Bei Untersuchungen der aktiven Wanderung von Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten aber auch dendritischer Zellen und Stammzellen verschiedenster Herkunft (Tier, Mensch) zeigte sich, dass diese Zelltypen mehr oder minder ausgedehnte Zellrückstände auf den Substraten hinterlassen (Kirfel et al. 2003; Mayer et al. 2004; Rigort et al. 2004). Detaillierte mikroskopische Untersuchungen und molekulare Charakterisierungen solcher Zellrückstände zeigten, dass neben kleinen ca. hundert Nanometer großen Membran-

patches bei etwa 20 bis 30 Prozent der Zellen dendritische „Materials Spuren“ einer Länge von bis zu mehreren hundert Mikrometern ausgebildet werden, die bislang nur wenig Beachtung gefunden haben. Diese können zum einen während der häufig zu beobachtenden Vor- und Rückbewegung der Zellen wieder aufgenommen aber auch durch Abreißen vom Zellkörper auf dem Substrat hinterlassen werden. Es handelt sich um etwa 120 Nanometer dicke membranumhüllte Filamente mit dendritischer Verzweigung an denen bis zu 1 Mikrometer große Membranpatches vorkommen können (Fuhr et al. 1998; Zimmermann et al. 1999). Ein Beispiel ist in Abbildung 1 gezeigt, das deutlich macht, dass es sich bei diesen „Zellspuren“ nicht um Filopodien handelt.

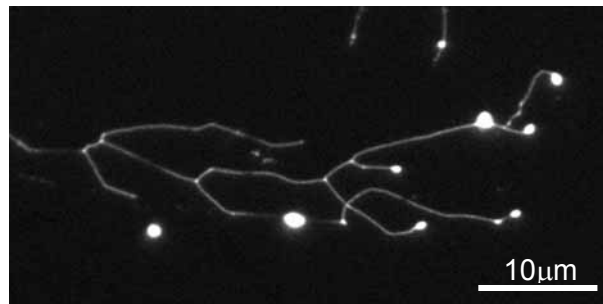


Abbildung 1: TIRF-mikroskopische Aufnahme einer Zellspur von L929

Auch ausgeprägte dendritische Zellausläufer von mehreren hundert Mikrometern Ausdehnung umfassen selten mehr als ein Prozent des Zellvolumens. Dies erklärt, noch dazu unter dem Gesichtspunkt des Nährstoffüberangebots der gängigen Zellkulturmedien, dass die Ausbildung derartiger Zellfilamente für den Energiehaushalt und Stoffwechsel der Einzelzelle auch bei Verlust der Zellspur keine Belastung darstellen sollte. Spezifische Proteinmarkierungen ergaben des Weiteren, dass die dendritischen Zellausläufer in repräsentativer Weise die molekulare Membranzusammensetzung der Erzeugerzelle widerspiegeln (Zimmermann et al. 2001). Dies legte frühzeitig den Gedanken nahe, abgetrennte Zellausläufer, im Folgenden als „Zellspuren“ bezeichnet, zur Oberflächencharakterisierung einzelner Zellen zu nutzen. So könnte beispielsweise auf einem speziell präparierten Chip und bei gerichteter Eigenmigration von Zellen die Zellspuraufnahme induziert werden. Nach schonender Abtrennung dieser Zellrückstände vom Zellkörper, könnten die Chips fraktioniert werden, so dass z. B. zwei getrennte Substratteile entstehen. Auf dem einen Substratteil befinden sich die Zellen und zuordenbar auf dem anderen Teil die dazugehörigen Spuren. Die Zellspuren könnten nun zerstörungsfrei aber auch kontaminierend bis zur kompletten Destruktion analysiert werden, ohne die noch lebende Verursacherzelle zu belasten, die weiter kultiviert werden kann (Duschl und Lankenau 2005). Abbildung 2 schematisiert dieses Prinzip am Beispiel einer Zelle.



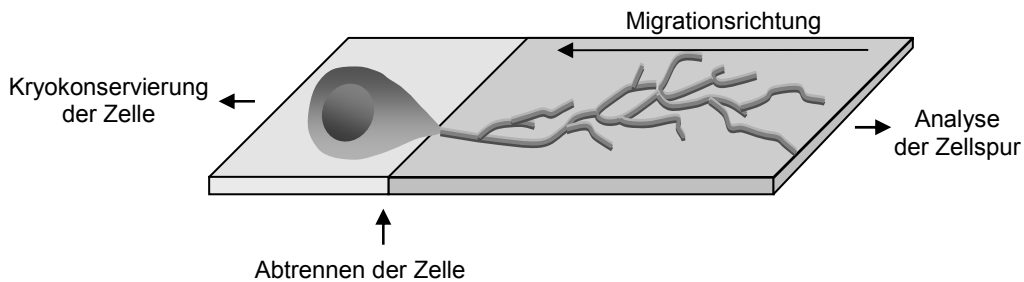


Abbildung 2: Schematische Darstellung der technischen Nutzung von Zellspuren.

Für eine biotechnologische Nutzung der Zellspuren, müsste dieser Prozess jedoch reproduzierbar gestaltet und wenn möglich, gesteuert werden können. Sehr wenig ist bisher jedoch über die Zellspurbildung, insbesondere die Dynamik und Beeinflussung durch Oberflächenstrukturierung bzw. -funktionalisierung bekannt. Diese Lücke mit neuen methodischen Ansätzen und vergleichenden Untersuchungen zu füllen, ist eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit.

Für die analytische Nutzung von Zellspuren ergeben sich vielfältige medizinische und biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten. Beispiele sind die Erfassung des Differenzierungszustandes von Stammzellen, ebenso wie die Charakterisierung der Aktivierung von Immunzellen oder des Metastasierungspotenzials von Krebszellen. Um die Zellspuranalyse technisch einsetzen zu können, ist es allerdings essenziell, den Zusammenhang zwischen der Zellspurentstehung und der Bewegung der Donorzelle zu verstehen, um gezielt auf beide Prozesse Einfluss nehmen zu können. Je nach Anwendung oder der zur Analyse der Zellspurparameter verwendeten Techniken, sind verschiedene Ansprüche an die Beschaffenheit der Zellspuren und die Dimensionierung des Substrats zu stellen. Sollen beispielsweise Zellspuren von mehreren Zellen parallel untersucht werden, ist es wünschenswert, dass die Zellen von einem definierten Startpunkt möglichst zielführend zu einem definierten Endpunkt migrieren und keine Überkreuzung der Trajektorien und damit der Spuren stattfindet. Spielt hingegen bei der zu untersuchenden Fragestellung der zeitliche Ablauf eine Rolle, wie bei der Expression von Oberflächenrezeptoren nach Stimulation, sollten die Zellspuren möglichst lang sein und nicht segmentiert auftreten. Diese Beispiele zeigen, dass eine Vielzahl von Parametern zu berücksichtigen sind und insbesondere die Erfassung der Dynamik der Zelladhäsion und Spurenbildung beobachtbar sein muss. Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand daher in der Entwicklung und dem Aufbau eines Mikroskopiersystems zur hochauflösenden Erfassung der Zelladhäsionsmuster und Zellspuren als auch der Dynamik ihrer Veränderung über Zeitraffersequenzen.

Markante Einflüsse auf die Zellspurentstehung sind über die Beeinflussung des Migrations- und das Adhäsionsverhalten der Zellen zu erwarten. Die Zellmigration ist ein biologischer Prozess von elementarer Bedeutung. Sie spielt z. B. bei der Embryogenese (Keller 2005; Montero und Heisenberg 2004), der Wundheilung im adulten Organismus

(Santoro und Gaudino 2005) oder der Ausbildung von Metastasen bei Krebserkrankungen eine wesentliche Rolle (Friedl und Wolf 2003). Für die Entstehung von Zellspuren in In-Vitro-Systemen ist die aktive Zellmigration eine offensichtliche Grundvoraussetzung. Großen Einfluss auf die Zellspurbildung sollte auch die Adhäsion der Zellen am Substrat besitzen.

Da sowohl Zelladhäsion als auch Zellmigration auf der Interaktion der Zellen mit der Substratoberfläche beruhen, liegt es nahe, dass man auch durch eine Veränderung der Oberfläche beide Prozesse beeinflussen kann. Grundsätzlich bieten sich hier zwei Strategien an. Biochemische Methoden, wie die Beschichtung mit Proteinen, modifizieren beispielsweise die Adhäsivität des Substrats, da die Anzahl der physiologischen Bindungsstellen variiert wird (Palecek et al. 1997). Technische Lösungen, wie das strukturierte Aufbringen von Stoffen (Polymere oder Metalle als Nanostrukturen) auf der Oberfläche, verändern die Topographie des Substrats und so die Reaktionen der Zellen (Jungbauer et al. 2004; Tan und Saltzman 2002).

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen experimentellen Aufbau zu entwickeln und umzusetzen, der die hochauflösende Beobachtung der dynamischen Prozesse der Zellmigration und Zelladhäsion auf künstlichen Substraten erlaubt. Des Weiteren sollte die Beobachtung der Dynamik des substratnahen Aktinzytoskeletts ermöglicht werden. Im Hinblick auf eine spätere technische Umsetzung sollte die Möglichkeit der parallelen Erfassung einer größeren Zahl von Zellen gegeben sein.

Wie sich in Vorexperimenten zeigte, handelt es sich bei Zelladhäsion, Zellmigration und Zellspurbildung um keine einheitlich ablaufenden Prozesse, sondern eher um stochastische Phänomene, so dass nicht jede beobachtete Zelle zu einem nutzbaren Datensatz führt (Richter et al. 2000). Der Messplatz sollte daher ausreichend lange Beobachtungszeiträume ermöglichen, um auch seltene Ereignisse im Verhalten der Zellen über die retrospektive Auswertung von Videosequenzen erfassen zu können. Daher müssen in dem zu realisierenden Mikroskopsystem die Kultivierungsrandbedingungen (Temperatur, CO<sub>2</sub>-Gehalt etc.) exakt einstellbar sein und über Tage ein automatischer Lauf garantiert werden. In der Kombination mit hochauflösenden Mikroskopieverfahren treten dabei technische Probleme wie beispielsweise Fokusschwankungen und Kondenswasserbildung auf, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit zu lösen waren.

Zur Abbildung derartig feiner Strukturen sind theoretisch verschiedene mikroskopische Beobachtungstechniken nutzbar, z. B. die "Confocal Laser Scanning" (CLS-) Mikroskopie, die Interferenz Reflexions (IR-) Mikroskopie oder die Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie. Rasterelektronenmikroskopische Verfahren hingegen eignen sich nicht für dynamische Beobachtungen und können daher nicht zur Lösung des Problems genutzt werden. Anzustreben ist, dass möglichst nur der substratnahe Zellbereich erfasst wird und über die Abbildungstechnik keine erhebliche Beeinflussung

der beobachteten Zelle erfolgt. Die optimale Zeitauflösung sollte zelltypspezifisch gewählt werden und in möglichst geschlossener Form die Änderungen der Adhäsionsmuster und die Formierung von Zellspuren wiedergeben.

Für die Darstellung der Dynamik der Prozesse war angestrebt, aufgrund rascher Systemreaktionen, möglichst wenig Bildverarbeitung einsetzen zu müssen und, wenn möglich, zusammenfassende Darstellungen in Bildform zu entwickeln, die es erlauben, die Dynamik beispielsweise über Musterdarstellung oder Färbung auszudrücken. Hierzu waren eigene Algorithmen zu entwickeln und über kommerziell erhältliche Software umzusetzen.

### 3 Zellbiologischer Hintergrund

Die für diese Arbeit relevanten Themengebiete Zellmigration und Zelladhäsion sind in den letzten Jahren Gebiete umfassender Forschung gewesen. Zur Einführung in die zellbiologischen Grundprinzipien werden daher einzelne bedeutende Aspekte aus dem aktuellen Wissensstand aufgegriffen und für die Bearbeitung der aufgeworfenen Fragen relevante Gesichtspunkte näher erläutert.

#### 3.1 Zellmigration

Die Zellmigration gehört zu den biologischen Prozessen von elementarer Bedeutung. Dabei ist sie sowohl in der Embryogenese, als auch im adulten Organismus sowie bei der Ausbildung von pathologischen Prozessen zu finden. Die Bildung der Keimblätter während der Gastrulation (Keller 2005; Montero und Heisenberg 2004) oder die Entwicklung des Nervensystems (Jones und Trainor 2005) und der Keimbahnen (Molyneaux und Wylie 2004) sind ohne gerichtete Zellmigration nicht möglich. Im adulten Organismus sind das Einwandern der Immunzellen in entzündetes Gewebe (Martin und Leibovich 2005) und die Reepithelialisierung nach Gewebeschäden im Rahmen der Wundheilung (Santoro und Gaudino 2005) prominente Beispiele für Zellmigration. Die Bedeutung der Migration zeigt sich aber auch in der Beteiligung an pathologischen Prozessen. Die Fehlregulation von Immunzellen führt zu chronischen Entzündungen (Luster et al. 2005) und die Metastasierung von Tumorzellen (Friedl und Wolf 2003) stellt eines der großen Probleme in der Krebsbekämpfung dar.

##### 3.1.1 Migrationsformen

Man unterscheidet zwei Hauptformen der Migration. Die amöboide, benannt nach der Amöbe *Dictyostelium discoideum*, und die mesenchymale Migration, die bei Zellen des Mesenchyms vorherrscht (Friedl 2004). Die Form der Zellen bei der amöboiden Migration entspricht einem Halbkreis. Die Bewegung erfolgt mit der runden Seite des Halbkreises voraus über die Querachse der Zelle und ist als kriechend zu beschreiben (Lee et al. 1993). Zellen mit mesenchymaler Migration zeigen einen polarisierten Phänotyp. In der klassischen Migrationsform folgt auf eine halbkreisförmige Front der Zellkörper mit einem lang gestreckten Zellausläufer am Zellende. Die Zellform erinnert an einen Trichter und die Bewegung erfolgt entlang der Längsachse der Zelle (Sheetz et al. 1998). Amöboide Migration ist auch in Eukaryoten bei hematopoetischen Stammzellen, Leukozyten und manchen Tumorzellen zu finden. Auf Grund von kurzlebigen, lockeren Adhäsionen erreichen die Zellen bei dieser Migrationsform eine hohe Geschwindigkeit. Beispielsweise bewegen sich Leukozyten mit einer Geschwindigkeit von 2-30  $\mu\text{m} / \text{min}$  (Friedl et al. 1998).

Die mesenchymale Migration ist bei Fibroblasten und Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie, wie z. B. Zelllinien aus dem Muskel oder dem Endothel, sowie bei Sarkomazelllinien zu beobachten. Die Migration umfasst hier einen Zyklus aus mehreren Einzelschritten (Cox und Huttenlocher 1998). Nach der Polarisation einer Zelle erfolgt der Vorschub der Zellfront, die Protrusion. Anschließend werden neue Adhäsionspunkte gebildet und verankert. Innerhalb der vorderen 15 Mikrometer der Zellfront wird die Kraft auf das Substrat übertragen (Dembo und Wang 1999). Die Adhäsionen im Bereich des Zellkörpers vermitteln nur kleine Kräfte und sind nicht direkt an der Vorwärtsbewegung der Zelle beteiligt (Benigno et al. 2001). In der elastischen Übergangszone, dem hinteren Bereich der Lamelle, führt die Kontraktion des Aktinzytoskeletts dazu, dass der Zellkörper zusammengezogen wird (Huttenlocher et al. 1995; Munevar et al. 2001a; Sheetz 1994). Wenn die Adhäsion zum Substrat an der Zellfront stärker und am Zellende schwächer ist, bzw. am Zellende aktiv gelöst wird, kann sich die Zelle über die Adhäsionspunkte hinweg vorwärts bewegen (Sheetz et al. 1998). Dabei verhält sich der Zellkörper mechanisch wie eine Art Frachtgut (Munevar et al. 2001a). Die Migrationsgeschwindigkeit bei dieser Migrationsart beträgt nur 0,1-2  $\mu\text{m} / \text{min}$  (Abercrombie et al. 1970a+b).

Die Migrationsgeschwindigkeit adhärenter Zellen wird durch die Ausbildung der Protrusionsfront und die Bildung neuer Adhäsionen an der Zellfront (Wessels et al. 1994) sowie durch die Effektivität der Lösung der Adhäsionen am Zellende (Palecek et al. 1998) bestimmt. Welcher der beiden Prozesse die Migration dominiert, hängt vom Substrat ab. Ist die Adhäsion zum Substrat schwach, dominiert die Protrusion. Bei mittlerer und starker Adhäsion zum Substrat ist das Ablösen des Zellendes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Zellmigration (Palecek et al. 1998). Bei den meisten Zellen besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Adhäsion am Substrat und der resultierenden Migrationsgeschwindigkeit (Huttenlocher et al. 1996; Palecek et al. 1997). Die maximale Geschwindigkeit erreicht die Zelle bei einer mittleren Substrathaftung (DiMilla et al. 1991; DiMilla et al. 1993; Huttenlocher et al. 1996; Palecek et al. 1997), da sie bei schlechterer Substrathaftung nicht genügend stabile Adhäsionspunkte ausbilden kann und bei zu starker Adhäsion die Ablösung des Zellendes verlangsamt erfolgt. Die Migrationsgeschwindigkeit wird durch die Anzahl der Liganden im Substrat, der Expression der Integrinrezeptoren in der Zelle und die Integrin-Ligand-Bindungsaffinität bestimmt. Bei maximaler Geschwindigkeit verhalten sich Änderungen in der Ligandenkonzentration auf der Oberfläche des Substrats und bei der Integrexpression reziprok zueinander (Palecek et al. 1997).

### **3.1.2 Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf die Zellmigration**

Das Zytoskelett eukaryotischer Zellen besteht aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktinfilamenten. Alle drei Strukturen sind an der Zellmigration beteiligt, wobei den Aktinfilamenten der größte Anteil zukommt. Dabei sind zwei Hauptbereiche zu unterscheiden. An der Zellfront wird durch die Polarität des Aktins Protrusion ermöglicht

und im Bereich des Zellkörpers und des Zellendes dient Aktin mittels der Aktin-Myosin-Wechselwirkung zum Aufbringen und Übertragen von Kräften.

### **3.1.2.1 Aktinstrukturen der Zellfront**

Das filamentöse Aktin (F-Aktin) wird unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) im Tretmühlenmechanismus durch Polymerisation aus Aktinmonomeren zusammengesetzt. Das entstehende Filament ist polarisiert mit einem schnell wachsenden „Plus“-Ende, an dem die Polymerisation erfolgt, und einem „Minus“-Ende, an dem die Dissoziation von Monomeren überwiegt (Woodrum et al. 1975). Da die Polymerisation am „Plus“-Ende des Filaments kontinuierlich erfolgt, erreichen die Monomere im Verlauf der Polymerisation das „Minus“-Ende des Filaments, wo sie dann abdissoziieren (Wang 1985). Die Polarität der Aktinfilamente wird von der Zelle genutzt um Protrusion zu ermöglichen. Die wichtigsten Strukturen im Zusammenhang mit Protrusion sind Lamellipodien und Filopodien. Bei Lamellipodien handelt es sich um flache, breite, schildartige Strukturen mit einem reich verzweigten Aktinnetzwerk und darin liegenden Aktinfilamentbündeln, den so genannten Mikrospeikes (Small 1981). Filopodien enthalten lange, parallele Aktinbündel und sind daher als dünne, zylindrische, nadelähnliche Strukturen zu beschreiben (Svitkina et al. 2003).

Die Regulation dieser Strukturen erfolgt hauptsächlich durch drei Guanosintriphosphatasen (GTP-asen) der Rho Familie. Dabei führt eine Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zur Ausbildung von Lamellipodien über die Aktivierung des „Actin-related“-Protein-Komplexes (Arp2/3) (Ridley et al. 2003). Ferner vermittelt die Aktivierung von Cdc42 zusätzlich die Bildung von Filopodien an der Zellfront. Unter dem Einfluss von RhoA wird die Aktin-Myosin-Wechselwirkung verstärkt, was für die Ausbildung von Stressfasern benötigt wird (Hall 2005).

Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes löst sowohl die Neubildung von Aktinfasern, als auch die Bildung der y-förmigen Abzweigungen an bestehenden Fasern im Aktinnetzwerk der Lamellipodien aus. Dabei ist unklar, ob Arp2/3 seitlich an ein bestehendes Aktinfilament bindet (Mullins et al. 1998) oder die Verzweigung der Filamente direkt am „Plus“-Ende initiiert (Pantaloni et al. 2000). Für beide Theorien existieren überzeugende experimentelle Belege. Mit zunehmendem Abstand von der Protrusionsfront sinkt der Verzweigungsgrad des Aktinnetzwerkes, was auf das Altern der Aktinfilamente zurück zu führen ist. Nach der Hydrolyse des gebundenen ATPs dissoziiert der Phosphatrest ab. Dadurch sinkt die Affinität des Arp2/3-Komplexes für das Aktinfilament (Blanchoin et al. 2000) und das Filament zerfällt an der Verzweigungsstelle. Proteine der ADF/Cofilin (Actin depolymerizing factor) Familie beschleunigen sowohl die Abdissoziation des Phosphatrestes (Blanchoin und Pollard 1998) als auch die Abdissoziation der Aktineinheiten am „Minus“-Ende des Filaments (Bamburg 1999).

Die Entstehung von Filopodien erfolgt nach dem klassischen Tretmühlenmechanismus und wird mit dem „convergent elongation model“ beschrieben (Svitkina et al. 2003).

Filopodien entstehen aus dem Aktinnetzwerk in Lamellipodien mittels veränderter Regulation. Zum einen sind in Filopodien erhöhte Mengen an Fascin zu beobachten. Fascin ist ein Protein, dass die Aktinbündelung vermittelt und demnach auch in Mikrospiques und Stressfasern zu finden ist (Yamashiro et al. 1998). Zum anderen wird das in Lamellipodien vorherrschende „capping“ verändert. Das „capping“ Protein (CP) bindet an die „Plus“-Enden von Aktin und verhindert dadurch die Bindung und Dissoziation von Aktinmonomeren (Schafer und Cooper 1995). Die Notwendigkeit des „cappings“ ist durch die Tunnel-Hypothese zu erklären (Carlier und Pantaloni 1997). Das Aktinzytoskelett ist im „steady-state“ weit vom Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau entfernt, so dass die Polymerisation deutlich bevorzugt wäre. Um trotzdem Protrusion zu ermöglichen, muss die Polymerisation gerichtet sein. Das CP bindet die älteren Filamente und verhindert somit, dass an älteren Filamenten polymerisiert wird. Damit findet Polymerisation nur vorne an der Membran statt, wo vorwiegend die neu gebildeten Filamente lokalisiert sind. In Übereinstimmung mit diesem Modell führt eine Überexpression von CP zu einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit (Hug et al. 1995). Im Falle der Filopodienbildung wird die Bindung des CP, z. B. durch die Bindung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) an CP, verhindert, so dass lange unverzweigte Filamente entstehen (Wear und Cooper 2004).

Bei Studien in In-vitro-Kultur konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der Proteine Arp2/3, Fascin und CP über die Entstehung von Lamellipodien bzw. Filopodien entscheiden. Um mit Arp2/3 beschichteten „Beads“ entstehen in zytoplasmatischen Extrakten entweder Aktinwolken mit einer netzartigen Struktur, wie in Lamellipodien, oder Aktinsterne, mit langen und unverzweigten Filamenten, die gebündelt werden können. Die Filamente der Sterne besitzen eine einheitliche Orientierung, beginnend mit den „Minus“-Enden am „Bead“ und werden kontinuierlich verlängert, wenn die Konzentration an Fascin hoch und an Arp2/3 und CP klein ist. Damit ergibt sich in Aktinsternen eine Filamentstruktur wie in Filopodien (Vignjevic et al. 2003). Inwieweit die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Strukturen mit den hier beschriebenen vergleichbar sind, wird in Abschnitt 6.6 diskutiert werden.

Sowohl in Lamellipodien als auch in Filopodien sind die Aktinfasern mit den schnell wachsenden „Plus“-Enden zur Membran hin orientiert (Small et al. 1978). Die wachsenden Filamente schieben dabei die Membran vorwärts. Theoretisch setzt die lokale Aktinpolymerisation genug Energie frei, um die Membran vorzuschieben. Eine mechanistische Erklärung stellen zwei verschiedene Modelle vor. Im „cortical expansion“ Modell steigt das osmotische Potenzial an der Front, z. B. durch das vermehrte Auftreten von Aktinmonomeren, so dass Wasser einströmt und das Aktinfilamentgel anschwillt (Condeelis 1993). Schlüssiger ist allerdings die Modellvorstellung, dass thermische Energie in Form der Braunschen Molekularbewegung Protrusion ermöglicht. Beim „elastic brownian ratchet“ Modell wird die thermische Energie in der Spannung oder Biegung von kurzen Aktinfilamenten gespeichert. Die elastischen Rückstellkräfte lassen die Filamente

gegen die Membran zurückschnellen, wobei diese vorgeschoben wird (Mogilner und Oster 1996). Abgesehen von den Kräften, die das Aktin auf die Membran ausübt, ist auch der Widerstand, den die Membran dem Aktin entgegensetzt, von entscheidender Bedeutung. Je größer die Spannung der Membran ist, desto kleiner ist die Protrusion (Raucher und Sheetz 2000).

### **3.1.2.2 Aktinstrukturen des Zellkörpers**

Aktin ist nicht nur für die Protrusion in den Lamellipodien der Zellen von Bedeutung, sondern spielt vor allem auch beim Nachziehen des Zellkörpers eine wichtige Rolle. Hauptsächlich besteht das Aktinzytoskelett des Zellkörpers aus langen Aktinbündeln, den Stressfasern, die den Zellkörper durchspannen und an einem oder beiden Enden in Adhäsionskomplexen enden. Die einzelnen Aktinfilamente in Stressfasern sind dabei bezüglich ihrer Polarisierung alternierend angeordnet (Small 1988). In Herzfibroblasten wurde gezeigt, dass die ventral lokalisierten Aktinfasern aus langen, überlappenden Bündeln bestehen, deren vorwiegende Polarisierung sich über die Länge der Bündel in jedem Bündel kontinuierlich ändert. Je näher die Fasern des Bündels der Zellfront sind, desto mehr „Plus“-Enden weisen in die Richtung der Zellfront (Cramer et al. 1997). Zusätzlich zu den Stressfasern können hinter dem Lamellipodium bogenförmige Aktinbündel auftreten, die die Form der Front nachzeichnen, sowie kleine sternförmige Anordnungen im Bereich zwischen der Front und dem Kern (Small 1988).

Eine deutliche Reduzierung der Migrationsrate in Myosin II-negativen Mutanten (Doolittle et al. 1995) legt nahe, dass die Generierung der Kraft zum Nachziehen des Zellkörpers mittels der Aktin-Myosin-Wechselwirkung vermittelt wird. Als mögliche Mechanismen sind ein Kontraktions- und ein Transportmodell beschrieben, die im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen noch genauer diskutiert werden (Abschnitt 6.3.2). Im Kontraktionsmodell entsteht eine gleichmäßige Spannung in der Zelle und die Vorwärtsbewegung erfolgt durch eine Asymmetrie der Substrathaftung. Dabei kann die Adhäsion an der Zellfront stärker sein oder am Zellende gelöst werden. Beim Transportmodell wird die Zelle direkt vom Myosin II bewegt. Dazu müssen die Aktinfasern eine einheitliche Polarisierung aufweisen und dabei fest am Substrat adhären. Die Zelle wird vom Myosin II über das Filament hinweg gezogen (Mitchison und Cramer 1996).

Aktinfilamente bilden die Basis für Zellmigration und Zellprotrusion. Die in der Literatur beschriebenen Einflüsse der Mikrotubuli (Small et al. 2002) und der Intermediärfilamente (Djabali 1999) sollen hier nicht näher erläutert werden, da im Rahmen dieser Arbeit auf das Aktinzytoskelett und seine Beteiligung an Migrations- und Adhäsionsvorgängen fokussiert wurde.



### **3.2 Zelladhäsion an Substraten**

Die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung ist in zwei Bereiche zu unterteilen. Direkte Zell-Zell-Kontakte werden von der Superfamilie der Cadherine vermittelt, während die Interaktion mit der extrazellulären Matrix (ECM) über die Familie der Integrine erfolgt. Cadherine spielen zwar unter anderem bei der Zellerkennung und der Zellsortierung in der Entwicklung eine wichtige Rolle (Takeichi et al. 1988; Takeichi et al. 2000), in dieser Arbeit wird aber die Interaktion der Zelle mit dem Substrat im Mittelpunkt stehen. Die Interaktion der Zelle über Integrine mit der ECM hat Einfluss auf alle Bereiche des Lebenszyklusses einer Zelle. Dabei beeinflussen sich Zelle und ECM gegenseitig. Bei den Proteinen der ECM handelt es sich meist um große Glykoproteine, einschließlich der Gruppe der Kollagene, der Fibronektine, der Laminine und der Proteoglycane (Gumbiner 1996). Die Adhäsionsstrukturen der Integrine mit der ECM werden in Hemidesmosomen und Fokale Adhäsionen (FA) unterteilt. Hemidesmosomen sind adhäsive Strukturen aus der Epidermis, die an Keratinfilamenten verankert sind (van der Flier und Sonnenberg 2001). Fokale Adhäsionen sind weiter verbreitet, binden intrazellulär an das Aktinzytoskelett und bilden verschiedene Kontakte mit ECM. Sie sind vor allem bei migratorischen Prozessen von Bedeutung (Geiger et al. 2001).

#### **3.2.1 Integrine**

Die Transmembranrezeptorgruppe der Integrine spielt sowohl bei physiologischen Prozessen, wie Embryogenese (Darribere et al. 2000), Angiogenese (Schwartz et al. 1995), Zelladhäsion und Zellmigration (Cox und Huttenlocher 1998) und Zellzyklus-Kontrolle (Schwartz und Assoian 2001), als auch bei pathologischen Prozessen wie der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle (Brakebusch et al. 1997; van der Flier und Sonnenberg 2001). Beispielsweise stellt die Interaktion zwischen Integrinen und Rezeptorkinasen, wie dem Epidermis-„Growth-Factor“- (EGF)-Rezeptor, die Basis für das adhäsionsabhängige Wachstum adhärenter Zellen dar (van der Flier und Sonnenberg 2001).

Bei Integrinen handelt es sich um nicht kovalent gebundene Heterodimere vom Typ I der Transmembranproteine (Hynes 1992), die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Physiologisch sind mehr als 20 verschiedene Rezeptoren bekannt (Hynes 1992). Integrine binden an das Laminin der Basallamina, interagieren mit der Gruppe der Kollagene und dem Peptid-Bindungsmotiv Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) aus Fibronektin (FN) und Vitronektin (Hynes 2002). Integrine selbst besitzen jedoch keine enzymatische Aktivität. Eine intrazelluläre Aktivierung, z. B. durch die Bindung von Talin (Hynes 2003; Tadokoro et al. 2003), und / oder extrazelluläre Ligandenbindung induziert die Bildung von „Clustern“ und eine Konformationsänderung. Im inaktiven Zustand ist die extrazelluläre Domäne abgeknickt und die intrazellulären Domänen sind lose, evtl. durch Proteine, miteinander verbunden. Bei der Aktivierung

werden die extrazellulären Domänen aufgerichtet und der Ligand kann gebunden werden. Bilden sich Homodimere oder Homotrimere aus, neigen diese ebenfalls zur „Cluster“-Bildung und liegen dann in der aktivierten Konformation vor. Extrazellulär ist die Bindung eines Liganden möglich, wenn  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nebeneinander lokalisiert sind (Hynes 2003). In adhären Zellen liegen Integrine in einer konstitutiv-aktivierten Konformation vor.

Bei Integrinen handelt es sich um bidirektionale Transmembranproteine, die nicht nur den Einfluss der ECM auf die Zelle vermitteln („outside-in-signalling“), sondern auch Signale von der Zelle auf die ECM übertragen („inside-out-signalling“). Beispielsweise ist die Anwesenheit von intaktem  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin zur Bildung von Fibrillen aus FN und zum Aufbau der ECM nötig (Hynes 1992).

Die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse wurden in Versuchen gewonnen, in denen eine quasi physiologische Adhäsion auf Proteinen der ECM untersucht wurde. Nichtsdestotrotz adhären Zellen auch auf unphysiologischen Substraten, wie Plastik oder Glas in der In-vitro-Kultur. Daher muss es auch dort eine Möglichkeit zur Aktivierung der Integrine geben. Eine Adsorption von Serumproteinen auf der Oberfläche bietet sich dabei als Möglichkeit an. Allerdings sind auch Zellen in serumfreiem Medium in der Lage auf artifiziellen Oberflächen zu adhären. Die intrazelluläre Aktivierung des Integrins durch Talinbindung oder die Homodimerbildung kommen da als mögliche Mechanismen in Frage, wenn extrazellulär kein Ligand zur Verfügung steht. Ebenso denkbar wäre, dass Zellen, die unter physiologischen Bedingungen ECM produzieren, in Kultur auf der von ihnen gebildeten Matrix adhären.

### **3.2.2 Adhäsionsstrukturen**

Durch die Aktivierung der Integrine bilden sich die eigentlichen Adhäsionsstrukturen, die Fokalen Adhäsionen (FA), aus. Dabei handelt es sich um eine Struktur von über 50 Proteinen, die intrazellulär die Anbindung der Integrine an das Aktinzytoskelett vermittelt und diverse Signalkaskaden aktiviert (Grande-Garcia et al. 2005).

Die Bestandteile der FA umfassen neben verschiedenen Kinasen und Phosphatasen sowie Modulatoren von GTP-asen (Zamir und Geiger 2001) auch Brückenproteine, wie Talin oder Vinculin, die die Einzelkomponenten des Komplexes miteinander verbinden (Giancotti und Ruoslahti 1999). Beispielsweise bindet Vinculin in der geschlossenen Form Paxillin, F-Aktin und den Lipidbilayer. Wird zusätzlich noch PI-4,5-bisphosphat gebunden ändert sich die Konformation des Vinculins und es werden Bindungsstellen für  $\alpha$ -Actinin, Talin und das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) frei (Zamir und Geiger 2001).

FA und ihre Varianten fibrilläre Adhäsion (FiA) und fokaler Komplex (FC) unterscheiden sich in Morphologie, Größe und subzellulärer Zusammensetzung. Bei FA handelt es sich

um flache, längliche Strukturen von einigen Mikrometern Größe, die in der Zellperipherie lokalisiert sind und häufig an FN-freie Bereiche binden. FA werden von  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin gebildet und enthalten vor allem  $\alpha$ -Actinin, Paxillin, Vinculin, Talin und Zyxin sowie hohe Anteile an tyrosinphosphorylierten Proteinen, wie die FA-Kinase (FAK) (Yamada und Geiger 1997). Fibrilläre Adhäsionen (FiA) entstehen an den Enden von FA, sind länger als diese und binden an FN-Fibrillen. Im Unterschied zu FA werden FiA von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin gebildet und enthalten hauptsächlich Tensin. Der Gehalt an tyrosinphosphorylierten Proteinen ist gering (Zamir et al. 2000). Als Vorläufer der FA sind die Fokalen Komplexe (FC) anzusehen. Dabei handelt es sich um kleine, punktförmige Adhäsionen an den Rändern der Lamellipodien, die bei der Migration und beim „Membran-ruffling“ auftreten (Small et al. 1998; Zamir und Geiger 2001). Im Gegensatz zu FA enthalten sie noch keinerlei Zyxin und nur einen geringen Gehalt an Vinculin und FAK (Zaidel-Bar et al. 2003). FA und FiA treten kurz nach der Bildung als Mischformen auf. Da FiA an deformierbares FN gebunden sind, werden die FiA mittels des Aktomysin-Komplexes in Richtung des Zellzentrums gezogen (Zamir et al. 2000). Diese Dehnung des FN spielt auch im Rahmen des „inside-out-signalling“ zur Einleitung der Fibrillogenese eine Rolle (Pankov et al. 2000). Zusätzlich detektiert die Zelle mit Hilfe ihrer Adhäsionen den Spannungszustand der ECM (Wehrle-Haller und Imhof 2002). Dies ist von Bedeutung, da härteres Substrats von den Zellen zur Adhäsion bevorzugt wird (Lo et al. 2000).

Die erste Beschreibung der Adhäsionsstrukturen erfolgte an Hand elektronenmikroskopischer Aufnahmen (Abercrombie et al. 1971). Später wurden FA auch mittels Interferenz-Reflexions-Mikroskopie (IRM) detektiert (Abercrombie und Dunn 1975; Izzard und Lochner 1976; Izzard und Lochner 1980). Der Abstand von FA zum Substrat beträgt ungefähr 10-20 Nanometer. Bei FiA ist ein deutlich größerer Abstand von ungefähr 100 Nanometern zu beobachten (Zamir et al. 2000).

Bei migrierenden Zellen müssen die Adhäsionspunkte mit der Verbindung zur ECM Halt bieten, damit die Zelle sich bewegen kann. Dabei werden die Adhäsionspunkte vorne an der Front gebildet und die Zelle schiebt sich darüber hinweg, wobei die Adhäsion ortsfest in Relation zum Substrat bleibt (Izzard und Lochner 1980). Der Lebenszyklus einer Adhäsion lässt sich dabei an Hand vier verschiedener Positionen innerhalb der Zelle einteilen (Smilenov et al. 1999). Die an der Front gebildeten Adhäsionen bleiben ortsfest, bis sie in den Bereich des Kernes gelangen. Während dieses als Reifung bezeichneten Prozesses, wird die Fläche der Adhäsionspunkte kontinuierlich größer. Im Bereich zwischen Kern und Zellende verschwindet ein Teil der Adhäsionen (Ballestrem et al. 2001) und die verbleibenden Adhäsionspunkte üben kaum noch Kräfte auf das Substrat aus (Beningo et al. 2001). Das ändert sich zum Zellende hin, wo Adhäsionen wieder unter Spannung stehen. Je nach Effektivität des Ablösungsprozesses werden die Adhäsionspunkte dann gelöst und die Integrine wandern entlang des Zellausläufers in Richtung der Zellmitte (Lauffenburger und Horwitz 1996) oder sie bleiben auf dem Substrat zurück (Chen 1981a).

### **3.3 Ablösung des Zellendes vom Substrat**

Die Adhäsionsfestigkeit von adhärenenten Zellen zum Substrat wird durch die Eigenschaften der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung bestimmt (Cox und Huttenlocher 1998; Huttenlocher et al. 1996). Zur Lösung der Adhäsionen sind zwei verschiedene Ablösungstypen beschrieben (Palecek et al. 1999). Wirken große intrazelluläre Kräfte und die Adhäsion zum Substrat ist gering, wird die Verbindung zwischen der ECM und dem Integrinrezeptor getrennt. Sind die intrazellulären Kräfte hingegen gering und es herrscht eine große Adhäsion zum Substrat, wird die Integrin-Zytoskelettbindung gelöst. Im ersten Fall hinterlässt die Zelle wenig, im zweiten Fall viel Integrin auf der Oberfläche (Palecek et al. 1998). Die Entstehung von Zellspuren am Zellende von migrierenden Zellen ist also unmittelbar mit dem Ablösen des Zellendes vom Substrat verknüpft.

Das Ablösen oder Abreißen des Zellendes über intrazelluläre Kräfte sorgt für eine ruckartige Vorwärtsbewegung des Zellkörpers. Dabei geht dem eigentlichen Abreißen eine aktive ATP-abhängige Kontraktion voraus (Chen 1981a). Eine Hemmung dieser Kontraktion, die durch die Aktin-Myosin-Wechselwirkung verursacht wird, unterbindet die Zellmigration, eine Stimulation kann sie beschleunigen (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Crowley und Horwitz 1995; Klemke et al. 1997; Wilson et al. 1991).

Reicht die von der Zelle durch Aktomyosin-Kontraktion aufgebrauchte Kraft nicht aus, um die Integrine von der Oberfläche abzureißen, wird die Ablösung des Zellendes Calpain-abhängig (Palecek et al. 1999). Die Protease Calpain schneidet nicht nur direkt die  $\beta$ -Untereinheiten des Integrin (Glading et al. 2002), sondern auch viele Proteine der FA, wie die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) oder Talin. Dadurch zerfällt der Adhäsionskomplex und die Verbindung zum Aktinzytoskelett wird aufgehoben (Beckerle et al. 1987; Cooray et al. 1996).

Intrazelluläre Signalkaskaden spielen beim Auf- und Abbau von Adhäsionen und den damit verbundenen Prozessen ebenfalls eine wichtige Rolle. Die zentrale Kinase in diesem Zusammenhang ist die FAK (Parsons 2003). Diese Kinase bindet an verschiedene zytoskelettassoziierte Proteine der FA, wie Paxillin (Schaller und Parsons 1995; Turner und Miller 1994) oder Talin (Chen et al. 1995), ist aber vor allem auch der Startpunkt vieler Signalkaskaden. Diese führen beispielsweise zu einer Erhöhung der Kontraktilität der Zelle oder zum Lösen der Verbindung der Aktinfilamente untereinander, da beispielsweise phosphoryliertes  $\alpha$ -Actinin nicht mehr an Aktin bindet (Mitra et al. 2005). Zellen ohne FAK bilden daher vermehrt größere Adhäsionen aus und migrieren schlechter (Alahari et al. 2002; Webb et al. 2002).

Bei der Deaktivierung der Signalwege im Zusammenhang mit Adhäsion kommt der Gruppe der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) eine besondere Bedeutung zu (Stoker 2005). Beispielsweise führt der Verlust der Protein-Tyrosin-Phosphatase-PEST (PTP-PEST) zu einer erhöhten Anzahl von Adhäsionen und einer reduzierten Ausbreitung und Migrationsrate (Tamura et al. 1998).

Die Konzentration von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ist ebenfalls ein potenter Regulator vieler Zellprozesse, wie Exozytose, Gentranskription, Zellkontraktion und Zellproliferation (Berridge et al. 2003). Im Falle von Zellhaftung und Zellmigration stabilisieren und destabilisieren  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme die Zell-Substrat-Adhäsion von verschiedenen Zelltypen (Sjaastad und Nelson 1997). In migrierenden 3T3-Fibroblasten konnten beispielsweise Einflüsse auf die Kontraktilität der Zelle und die Zusammensetzung der Adhäsionspunkte beobachtet werden (Munevar et al. 2004).

### **3.4 Zellspuren**

Während der Migration von Fibroblasten bilden die Zellen lange Zellausläufer, die sprunghaft nachgezogen werden. Dabei reißt der Ausläufer kurz vor dem Ende ab und ein Teil des Zellmaterials bleibt an der Oberfläche zurück (Bard und Hay 1975; Chen 1981a; Chen 1981b). Da dieses Abreißen des Ausläufers von der Substratoberfläche nicht durch Lösen der Integrinbindung geschieht, wurde dieser Prozess auch als „membrane ripping“ bezeichnet (Lauffenburger und Horwitz 1996). Insgesamt ist dem von Zellen zurückgelassenen Material lange keine große Aufmerksamkeit zu Teil geworden, da die Strukturen mit konventioneller Lichtmikroskopie nicht zugänglich sind. Genauere Beschreibung erfolgte dann unter Zuhilfenahme von hochauflösenden Mikroskopietechniken wie der „Atomic-Force“-Mikroskopie (AFM), der „Scanning-Electron“-Mikroskopie (SEM) und der Interferenz-Reflexions-Mikroskopie (IRM) (Fuhr et al. 1998).

#### **3.4.1 Morphologische Beschreibung**

Die meisten Untersuchungen wurden an Spuren von L929-Fibroblasten durchgeführt. Bei diesen Zellspuren handelt es sich um hoch organisierte Strukturen, die aus filamentösen Bereichen mit Verzweigungen bestehen. Die Filamente besitzen eine Breite zwischen 60 und 100 Nanometern und eine Höhe von 100-130 Nanometern (Fuhr et al. 1998). Verzweigungspunkte sind meist etwas höher und erreichen zwischen 200-400 Nanometer an Höhe. Die beobachteten Verzweigungswinkel liegen zwischen 90 und 100 Grad und sind erstaunlich konstant. Einmal abgelegte Spuren werden von den Zellen nicht mehr aufgenommen und können von anderen Zellen überwandert werden, ohne dass dabei eine Veränderung an Zelle oder Spur zu erkennen ist. Daher kann es zu überkreuzten Spuren von zwei verschiedenen Zellen kommen. Allerdings können auch einzelne Teile einer Zellspur überlappen oder sich kreuzen (Zimmermann et al. 1999). Zellspuren können mehrere 100 Mikrometer lang werden. Die genaue Morphologie einer Zellspur hängt sowohl vom Zelltyp als auch von der verwendeten Oberfläche ab. Allerdings können einige Grundmotive definiert werden (Fuhr et al. 1998).

Die Zellspur unterteilt sich in drei Bereiche. Der erste Teil der Spur ist das so genannte „near field“. Dieser Teil der Spur befindet sich direkt am Zellkörper und ist noch mit der Zelle verbunden. Daher ist die Lage dieses Spurbereiches während der Migration der

Zelle veränderlich und Material aus diesem Teil kann von den Zellen wieder resorbiert werden. Der zweite Teil wird als „transitional field“ bezeichnet und ist von variabler Länge. Dieser Teil der Spur hat Haftung zum Substrat und ist ebenfalls noch mit der Zelle verbunden. Allerdings wird bereits dieser Teil fast vollständig von der Zelle zurückgelassen. Der dritte Teil bezeichnet den Anfang der Spur und ist daher am weitesten von der Zelle entfernt („far field“). Dieser Teil der Spur haftet stark am Substrat und ist vollständig von der Zelle getrennt. Der gesamte Materialverlust bei Entstehung einer Zellspur beträgt normalerweise zwischen 0,3 und 0,7 Prozent des Gesamtvolumens und kann bis auf maximal 1 Prozent ansteigen. Zellspuren im eigentlichen Wortsinn umfassen nur den zweiten und dritten Teil (Fuhr et al. 1998).

Eine Zellspur setzt sich aus linearen und nichtlinearen Bereichen zusammen. Bei den linearen Bereichen kann man gerade Linien sowie die davon abgeleiteten Strukturen, wie bogenförmige Linien, Linienenden, Verzweigungen, Kreuzungen und sogar Kreise bzw. Schleifen voneinander unterscheiden. Die nichtlinearen Bereiche setzen sich aus Kugeln und knotenförmigen Verdickungen bzw. Verzweigungen zusammen. Eine typische Spur besteht aus Linienelementen mit Verzweigungen.

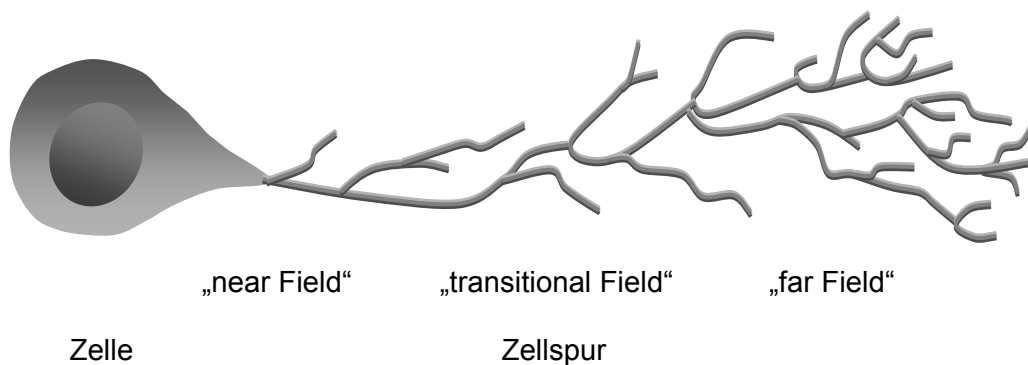


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Zelle mit Zellspur. Der Verzweigungsgrad des „transitional Field“ ist von der Migrationsgeschwindigkeit abhängig (s. 3.4.3)

### 3.4.2 Zusammensetzung von Zellspuren

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Zusammensetzung der Spur untersucht. Fluoreszenzfärbungen zeigten, dass es sich bei den Zellspuren um membranumhüllte Strukturen handelt (Zimmermann et al. 2001). In den kontinuierlichen Bereichen konnte ferner F-Aktin gefunden werden. Segmentierte Bereiche enthalten kein F-Aktin mehr, allerdings konnte mit Antikörpern globuläres Aktin detektiert werden. Zusätzlich wurde in den dickeren Verzweigungspunkten  $\beta$ -Tubulin nachgewiesen. Proteine der FA wurden nicht gefunden (Fuhr et al. 1998). Bei der Analyse von Oberflächenrezeptoren wurde der Transferinrezeptor CD 71 (Zimmermann et al. 2001) und das MHC I Molekül in der Membran von Zellspuren detektiert.

### **3.4.3 Entstehung von Zellspuren**

Die Anzahl der Zellen, die Spuren hinterlassen, hängt von der Zellart ab. L929-Fibroblasten z. B. hinterlassen viele Zellspuren, wohingegen 3T3-Fibroblasten nur wenige Spuren erzeugen (Fuhr et al. 1998). Die Betrachtung des „near field“ kann Hinweise auf die Entstehungsmöglichkeiten einer Zellspur geben. Die Autoren schlagen eine Art „membran ruffling“ wie bei der Bildung von Lamellipodien an der Zellfront vor. Die Membran wird zusammen mit dem Aktinzytoskelett vorgeschoben und wieder zurückgezogen. Bei der Retraktion bieten die Aktinfasern mehr Widerstand als die Membran und bleiben zurück, so dass sich eine Zellspur bildet (Fuhr et al. 1998).

Eine interessante Beobachtung konnte später bei Lebendbeobachtungen im „near field“ von Spuren der Zelllinie L929 gemacht werden. Dieser Bereich erscheint bei der Beobachtung mittels IRM zuerst punktförmig, nach einer Stunde erkennt man jedoch an derselben Stelle vollständige Spuren (Richter et al. 2000). Dieses Phänomen wurde nicht weiter untersucht, da Zellen nur unter normaler Durchlichtbeleuchtung mobil waren. Beobachtung mittels IRM bietet zwar genügend Kontrast, um die Zellspuren zu sehen, führt aber dazu, dass die Zellen nicht mehr migrierten. Zur Erklärung des Phänomens wurde von Richter et al. (2000) vorgeschlagen, dass die Spuren innerhalb der Stunde in das Beobachtungsfeld eingesunken sein könnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten ähnliche Effekte beobachtet werden (s. 5.4.2).

Im Allgemeinen ist das „far field“ von Zellspuren der Zelllinie L929-stark verzweigt. Das daran anschließende „transitional field“ ist von variabler Länge und entweder genauso stark oder geringer verzweigt (Fuhr et al. 1998). Dabei kann der Verzweigungsgrad mit der Migrationsgeschwindigkeit der Zellen korreliert werden. Stark verzweigte „transitional fields“ werden von langsam wandernden Fibroblasten gebildet und schneller wandernde Zellen hinterlassen gering verzweigte Spuren, siehe Abbildung 3 (Richter et al. 2000).

### **3.4.4 Alterungsprozess von Zellspuren**

Wenn Zellspuren altern, fangen sie an zu segmentieren und bilden kugelförmige Elemente. Die Segmentierung einer Spur beginnt erst, nachdem die Spur mit der Zelle nicht mehr verbunden ist. Daher beobachtet man Segmentierung immer zuerst am Ende, d. h. dem ältesten Teil der Spur. Durch osmotischen Stress, wie die Behandlung mit hypotonem Medium (Fuhr et al. 1998) oder permanente Beleuchtung, wie z. B. während mikroskopischer Beobachtung (Richter et al. 2000) kann die Segmentierung der Spuren beschleunigt werden.

In der Literatur sind derartige Prozesse bereits näher beschrieben worden. Wird bei adhärennten Zellen das Aktinzytoskelett aktiv zerstört, ziehen sich die Zellen zusammen und runden sich ab. Dabei bleiben sternförmig um den Zellkörper Zellausläufer zurück, die noch am Substrat haften. Während die Adhäsionsfläche verkleinert wird, ist die Membran von Ausläufer zu Ausläufer gespannt und daher leicht nach innen gekrümmt. Irgendwann

runden sich die Zellen vollständig ab und der Ausläufer bleibt auf dem Substrat zurück und wird von der Zelle getrennt. Durch Entnetzung bilden sich dabei entlang des Ausläufers zuerst Einschnürungen, aus denen dann kleine Kugeln oder Perlen entstehen (Bar-Ziv et al. 1999). Bei diesem als „pearling“ bezeichneten Prozess handelt es sich um ein generelles Phänomen, das bei unter Spannung stehenden tubulären Strukturen beobachtet werden kann und für Lipidbilayer theoretisch beschrieben wurde (Bar-Ziv und Moses 1994).

### **3.4.5 Zellspuren anderer Zellarten**

Zellspuren von anderen Fibroblasten wie z. B. der Linie 3T3 unterscheiden sich morphologisch deutlich von L929-Spuren. Bei 3T3-Zellen wurden deutlich weniger Spuren gefunden, die auch nur im „near field“ kontinuierlich zu sehen waren (Fuhr et al. 1998). Daher gehen die Autoren davon aus, dass Spuren von 3T3-Zellen weniger stabil sind, schneller segmentieren und verschwinden. Grundsätzlich wurden Spuren bei diesen Zellen nur an Zellausläufern gefunden und nicht direkt an den Zellkörper anschließend.

Die Bildung von Zellspuren beschränkt sich nicht nur auf langsam migrierende Fibroblasten, sondern wurde auch bei Makrophagen und Sarcomazellen sowie bei humanen Osteosarcomazellen gefunden (Fuhr et al. 1998). Invasive Melanomzellen hinterlassen membranumhüllte Fragmente, die polymerisiertes Aktin und Integrin  $\beta 1$  enthalten können (Mayer et al. 2004). Bei schnell migrierenden Keratinozyten unterteilen sich die hinterlassenen Makroaggregate in zwei Gruppen, die sich in Aussehen, Lokalisation und Integrinzusammensetzung unterscheiden (Kirfel et al. 2003). Dabei entstehen die größeren Aggregate aus der Adhäsion von FA und die kleineren als Rückstände von Hemidesmosomen (Rigort et al. 2004).

## **3.5 Einfluss strukturierter Oberflächen auf Zellen**

Der Zustand von Zellen in ihrem natürlichen Gewebeverband ist beeinflusst von der Zellumgebung. Dabei sind lösliche Faktoren sowie direkte Zell-Zell-Kontakte und die Interaktion mit der ECM zu berücksichtigen. Prominentes Beispiel für die Wichtigkeit des Einflusses der Umgebungsmatrix ist der Prozess der Anoikis. In adhären Zellen wird Apoptose ausgelöst, wenn die Zellen den Kontakt zur Umgebung verlieren (Grossmann 2002; Reddig und Juliano 2005). Eine Disfunktion in diesem Bereich führt unter anderem zur Metastasierung von Krebszellen (Wang 2004). Daher sind die Prozesse, die der Wechselwirkung von Zellen mit der Matrix zu Grunde liegen, bedeutende Untersuchungsgebiete.

Die physiologische Umgebung der Zellen ist in vivo nicht homogen. Vom gleichmäßigen nanostrukturierten Netzwerk der Basalmembran bis hin zum strukturierten Gerüst aus Fibrinfibrillen mit Abständen von einigen Mikrometern im Bindegewebe oder während der



Wundheilung ist ein breites Spektrum an verschiedenen Formen der Strukturierung der Zellumgebung zu finden (Abrams et al. 2000; Wezemann 1998). Die meisten wichtigen Erkenntnisse über die Interaktion von Zellen mit der Umgebungsmatrix wurden mit homogen beschichteten Substraten gewonnen (Zamir und Geiger 2001), auch wenn diese Substrate nicht die konkrete in-vivo Situation widerspiegeln. Für weitere Fortschritte beispielsweise auf dem Gebiet des „Tissue Engineerings“ wird es von Nöten sein, die Strukturierung der physiologischen Matrix in die Untersuchungen miteinzubeziehen.

Zur Strukturierung der Substratoberfläche können zwei Wege beschritten werden. Der erste Weg beruht auf der Beeinflussung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung. Dabei werden auf antiadhäsiven Oberflächen adhäsive Bereiche durch die Beschichtung mit FN oder anderen Matrixproteinen geschaffen. Mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass Zellen sich ab einer Mindestgröße (Durchmesser  $\geq 25 \mu\text{m}$ ) auf einzelnen adhäsiven Inseln ausbreiten (Chen et al. 1997). Liegen die adhäsiven Punkte unter dieser Größe ( $0,6\text{--}9 \mu\text{m}^2$ ), ist es für Zellen auch möglich an mehreren Punkten zu haften. Dabei dürfen die Abstände 25 Mikrometer aber nicht überschreiten (Lehnert et al. 2004). Bei der Adhäsion an mehreren Punkten spannt sich das Zytoskelett zwischen den adhäsiven Punkten auf und die Zelle nimmt eine dementsprechende Form an. Interessanterweise gibt es für diesen Vorgang auch eine untere Grenze. Werden die Abstände zwischen den Adhäsionsbereichen kleiner als 2 Mikrometer, erkennt die Zelle das Substrat als unstrukturiert und homogen (Lehnert et al. 2004). Interessante Ergebnisse konnten auch mit Strukturen im Nanometerbereich erzielt werden. So wurde mit Hilfe von nanostrukturierten Oberflächen der optimale Abstand für das „Clustern“ der Integrine bestimmt (Arnold et al. 2004).

Bei den bisher beschriebenen Experimenten ist festzustellen, dass nicht nur die Adhäsionsfläche, sondern auch die Geometrie und Anordnung der Adhäsionen eine Rolle spielt, so dass sich Zellen an vorgegebene Strukturen anpassen. Daher ist anzunehmen, dass es auch Einflüsse auf die Zellen gibt, die sich aus der rein topographischen Strukturierung der Substrate ableiten lassen. Mit diesem Ansatz gelang es Jungbauer und Kollegen morphologische Veränderungen von genetisch modifizierten Melanozyten durch eine strukturierte Oberfläche zu neutralisieren (Jungbauer et al. 2004). Zudem lässt sich die Zellmigration von Neutrophilen entlang von Linienstrukturen auf dem Substrat ausrichten (Tan und Saltzman 2002). Ebenso konnte ein Effekt auf das Proliferationsverhalten von Epithelzellen der Kornea durch strukturierte Oberflächen gezeigt werden (Liliensiek et al. 2006). Diese Beispiele zeigen, dass auch der topographische Einfluss des Substrats auf die Zellen großen Einfluss haben kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Strukturen untersucht, deren Größe sich oberhalb der makromolekularen und unterhalb der zellulären Ebene befindet. Dieser Bereich von 100 Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern ist technisch schwer zugänglich. Auf der zellulären Ebene liegen einzelne Adhäsionen in dieser Größenordnung.

## 4 Methodischer Teil

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glucose	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Fluka, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland
Sylgard, Silicone Elastomer Kit 184 (PDMS):	Dow Corning GmbH, Wiesbaden, deutschland
Pluronic	Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Appli Chem GmbH, Darmstadt, Deutschland

#### 4.1.2 Antikörper und Farbstoffe

Calcein ( $\lambda\text{Ex}_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$ , $\lambda\text{Em}_{\text{max}} = 514 \text{ nm}$ ):	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Calcein Red Orange ( $\lambda\text{Ex}_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$ , $\lambda\text{Em}_{\text{max}} = 591 \text{ nm}$ ):	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Carbocyanin (Cy2) ( $\lambda\text{Ex}_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$ , $\lambda\text{Em}_{\text{max}} = 508 \text{ nm}$ ) gekoppelter Polyklonaler Antikörper (IgG) aus Ziege gegen Maus IgG (H+L):	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
DAPI ( $\lambda\text{Ex}_{\text{max}} = 358 \text{ nm}$ , $\lambda\text{Em}_{\text{max}} = 461 \text{ nm}$ ):	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dihydrocalcein ( $\lambda\text{Ex}_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$ , $\lambda\text{Em}_{\text{max}} = 514 \text{ nm}$ ):	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Monoklonaler Antikörper (IgG1) aus Maus gegen Maus FAK:	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Phalloidin ( $\lambda_{\text{Ex}_{\text{max}}} = 546 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}_{\text{max}}} = 573 \text{ nm}$ ):

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit ( $\lambda_{\text{Ex}_{\text{max}}} = 492 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}_{\text{max}}} = 517 \text{ nm}$ ):

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

### 4.1.3 Zellkultur

#### 4.1.3.1 Zellen

3T3

DSMZ, Nr. ACC173, Braunschweig, Deutschland

C2C12

ATCC, Nr. CRL-1772, Wesel, Deutschland

CHO

ECACC, Nr. 85050302, Salisbury, Großbritannien

L929

DSMZ, Nr. Acc 2, Braunschweig, Deutschland

#### 4.1.3.2 Medien / Puffer

DMEM Hepes Modifikation

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

HAM's F12

Biochrom, Berlin, Deutschland

HANKS Puffer

Biochrom, Berlin, Deutschland

HEPES Puffer

Biochrom, Berlin, Deutschland

PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ )

Biochrom, Berlin, Deutschland

PBS (w/o)

Biochrom, Berlin, Deutschland

RPMI 1640

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

#### 4.1.3.3 Zusätze

Fibronektin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

FKS

0341G Biochrom, Berlin, Deutschland

Gentamycin

Biochrom, Berlin, Deutschland

L-Glutamin

Biochrom, Berlin, Deutschland

Penicillin/Streptomycin

Biochrom, Berlin, Deutschland

Pferdeserum

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin/EDTA

Biochrom, Berlin, Deutschland

#### 4.1.3.4 Transfektion

pEGFP-Aktin DNA Plasmid:

BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland

pDsRed2-C1 DNA Plasmid:

BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland

Optifect Reagenz

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

E. coli Top 10™

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Qiagen® Spin mini-Kit

Qiagen, Hilden, Deutschland

### 4.1.4 Labormaterialien und Laborgeräte

Deckglaskammer NUNC

Nalge NUNC, Wiesbaden, Deutschland

Zählkammer

Thoma, Carl Roth GmbH & Co Kg, Karlsruhe,  
Deutschland

Zentrifuge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Sterilbank	Baker Company, Stanford, USA
Strukturierte Glassubstrate (10x10 mm):	NaWoTec GmbH, ein Unternehmen der Carl Zeiss SMT AG, Rossdorf, Deutschland

#### 4.1.5 Mikroskopie

CPLN 10xRC:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
IX 71 mit IX2-RFAL:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
IX2-ARCEVA:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
IX2-RFAEVA:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
IX2-DIC 60 Einheit (IX2-LWPO, IX2AN, Prisma):	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Laser: Argon 488	Laser 2000, München, Deutschland
PlanAPO 60xOil TIRFM:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
U-LH100HG Lampe:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
U-MNIBA2:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
U- N41002:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Nose piece stage:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Inkubations- Kammer:	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Uniblitz VMM-T1 Shutter Driver / Timer:	Uniblitz, Garching, Deutschland
Immersionsöl (RT):	Olympus Deutschland, Hamburg, Deutschland
Immersionsöl (Brechungsindex 1,514 bei 37 °C):	Cargille über Winopal Forschungsbedarf, Ahnsbeck, Deutschland
Kamera Orca-ER, C4742-95-12ERG:	Hamamatsu, Garching, Deutschland
Axiovert 200 M mit LSM 510 Meta mit entsprechender Software:	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena, Deutschland
EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil DIC:	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena, Deutschland
Diodenlaser: 405 nm, 30 mW:	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena, Deutschland
Argon Laser: 458, 477, 488 und 514 nm, 30 mW:	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena, Deutschland
Helium-Neon Laser 1: 543 nm, 1 mW:	Carl Zeiss AG Deutschland, Jena, Deutschland
Openlab Software	Improvision, Coventry, UK
Image J	NIH, Bethesda, USA

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

L929-Fibroblasten wurden in RPMI 1640 Medium mit 3,6 mM L-Glutamin kultiviert. 3T3-Fibroblasten und C2C12-Muskelzellen wuchsen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 200 mM L-Glutamin. RPMI und DMEM enthielten jeweils 25 mM Hepes Puffer. CHO-Epithelzellen wurden in HAM's F12 Medium mit 1,75 mM L-Glutamin kultiviert. Alle Medien wurden mit 10 Prozent fötalem Kälberserum (FKS) und 1 Prozent Gentamycin versetzt. Alle Zellen wurden nach jeweils 3-4 Tagen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen zweimal mit HANKS Puffer gespült und mit Trypsin/EDTA versetzt. Die Trypsinmengen und die Trypsinierungszeiten richteten sich jeweils nach der Stärke der Substrathaftung. Je nach Wachstumsverhalten kamen unterschiedliche Zellzahlen auf eine 25 cm<sup>2</sup> Flasche zum Einsatz (s. Tabelle 1). C2C12-Muskelzellen durften nicht dichter als bis zu 50-60 Prozent Konfluenz aufwachsen, da sonst die Differenzierung zu Myotuben einsetzt. Zur Differenzierung wuchsen die Zellen bis zur Konfluenz auf und das Medium wurde statt mit FKS mit 2 Prozent Pferdeserum versetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden 10<sup>3</sup> Zellen / cm<sup>2</sup> als Präparat für 48 Stunden bei 37 °C 95 Prozent Feuchtigkeit und 5 Prozent CO<sub>2</sub> in 9,4 cm<sup>2</sup> Deckglas Kammern kultiviert.

Zelllinie	Zellzahl / Flasche	Trypsinmenge [ml]	Trypsinierungszeit [min]
3T3	2 x 10 <sup>4</sup>	0,5	6
CHO	1 x 10 <sup>4</sup>	0,5	8-10
C2C12	8 x 10 <sup>3</sup>	0,5	8-10
L929	5 x 10 <sup>4</sup>	0,1	4

Tabelle 1: Übersicht über die Zellkultivierung

### 4.2.2 Beschichtung von Substratoberflächen

Zur Modifikation von Substratoberflächen aus Glas wurden diese mit dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin (FN) beschichtet. Dazu wurde eine Seite einer 2 x 4,4 cm<sup>2</sup> Deckglas Kammer 30 Minuten mit einer FN-Lösung (50 µg / ml in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Um eine gleichmäßige Beschichtung zu erreichen, darf die Lösung nicht eintrocknen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Kammer 2 x mit 1 ml PBS gespült. Die zweite Seite der Deckglas-Kammer diente als Kontrolle und wurde genauso behandelt. Die fertigen Kammern wurden direkt eingesetzt. Da der Adhäsionsprozess auf FN sehr gut und schnell vor sich geht, konnten die Zellen bereits nach 2 Stunden beobachtet werden. Daher wurde die Zelldichte auf 10<sup>4</sup> Zellen / cm<sup>2</sup> erhöht. Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich Inkubationszeiten von 6 bzw. 24 Stunden auf FN durchgeführt.

### **4.2.3 Fluoreszenzverfahren**

Zur Analyse von intrazellulären Bestandteilen kommen Fluoreszenzverfahren zur Anwendung. Dazu werden die Targetstrukturen mittels direkter oder indirekter Markierung an Fluorophore gekoppelt. Bei den direkten Verfahren können die Targetstrukturen mit fluoreszierenden Farbstoffen wie z. B. DAPI oder Phalloidin direkt gefärbt werden, bei den indirekten werden die Strukturen über Antikörper erkannt, die an das Fluorophor gekoppelt sind. Für Lebenduntersuchungen werden zytosolische Zellfarbstoffe und zusätzlich Fusionsproteine mit fluoreszierenden Proteinen (GFP) eingesetzt.

#### **4.2.3.1 Färbungen**

Zur Beobachtung von Adhäsionskontaktmustern mussten lebende Zellen gefärbt werden. Dazu wurde als erstes ein Volumenzellfarbstoff gewählt, der die intakte Zellmembran passieren kann und in der Zelle angereichert wird. Da die Carboxylgruppen von Fluoreszenzfarbstoffen im Zellmedium geladen wären, werden diese mit Acetoxymethyl (AM)-Ethern als Schutzgruppe umgesetzt. So erhält man ein ungeladenes Fluorophor, das membrangängig ist. Intrazellulär wird der AM-Ester von unspezifischen Esterasen hydrolysiert (Homolya et al. 1993). Das Fluorophor erhält seine Ladung zurück und kann die Zelle nicht mehr verlassen (Ionenfallenmechanismus). Zusätzlich wird der Farbstoff in der Zelle angereichert (progressive Färbung), da durch die Hydrolyse der Konzentrationsgradient des veresterten Farbstoffs über die Membran hinweg aufrechterhalten wird. Da die Zellen gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche beladen werden, ist nicht mit Farbstoffschwankungen innerhalb einer Zelle zu rechnen, allerdings können verschiedene AM-Fluorophore von verschiedenen Zellen unterschiedlich gut aufgenommen werden (Esposito et al. 2002). Des Weiteren sind die Hydrolyseprodukte (Essigsäure und Formaldehyd), sowie der Farbstoff selbst in größeren Konzentrationen zellschädlich, so dass es bei zu großen Farbstoffkonzentrationen zu Vergiftungserscheinungen kommen kann (Liminga et al. 1999).

Die Farbstoffe Calcein, Dihydrocalcein und Calcein Red Orange beruhen auf dem oben beschriebenen Mechanismus. Die beiden blau anregbaren Farbstoffe Calcein und Dihydrocalcein konnten in allen Zellen verwendet werden, Calcein Red Orange wirkte auf L929-Fibroblasten innerhalb kürzester Zeit zytotoxisch und konnte daher nicht eingesetzt werden. Calcein Red Orange hat allerdings den Vorteil mit niederenergetischerem, grünen Licht angeregt zu werden, was bei Langzeitstudien Zellschäden durch Strahlung vorbeugt. Dieser Farbstoff ist allerdings auch in der AM-Form fluoreszent und kann daher nicht im Medium verbleiben, da sonst eine hohe Hintergrundfluoreszenz entstehen würde. Dihydrocalcein hingegen muss nach der Abspaltung der Esterschutzgruppen in der Zelle zusätzlich noch oxidiert werden, bevor der Farbstoff fluoresziert.

Zur Färbung mit Calcein, Dihydrocalcein und Calcein Red Orange wurde ein spezieller Puffer (Calceinpuffer) angemischt und die Zellen einmal in dem Puffer gewaschen. Dieser Puffer ist in der Zusammensetzung normalem Medium nachempfunden und ermöglicht

die Kultivierung der Zellen bis zu 24 Stunden. Der Calceinpuffer wurde aus 10 fachen Lösungen immer frisch zusammengesetzt (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, und wahlweise 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Da AM-Ester von Fluoreszenzfarbstoffen in der Regel schlecht wasserlöslich sind, wurde zur Aufnahme des Farbstoffs ein nichtionisches und nichttoxisches Detergenz (Pluronic F127) als Lösungsvermittler eingesetzt. 50 Mikrogramm Farbstoff wurden in je 20 Mikroliter Pluronic F127 und wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und dann auf die Endkonzentration verdünnt. Nach der Inkubation wurde die Farbstofflösung durch normalen Calceinpuffer ersetzt und die Zellen direkt mikroskopiert. Für Langzeitstudien wurde die Konzentration reduziert und die Zellen verblieben während des gesamten Experimentes in der Farbstofflösung.

Da die Calceinfarbstoffe ungebunden im Zytosol liegen, werden sie nur durch eine intakte Zellmembran in der Zelle gehalten. Dies ist bei fixierten Zellen nicht mehr gegeben. Daher müssen hier Farbstoffe eingesetzt werden, die mit den zytosolischen Proteinen reagieren können. Dabei kommen zwei verschiedene Mechanismen in Frage: Thiol- oder Aminreaktive Farbstoffe. Erstere reagieren intrazellulär mittels eines endständigen Chlorids mit der Thiolgruppe von Glutathion. Diese Verbindung wird bei Teilungen gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt und ist fixierbar. Aminreaktive Farbstoffe, wie der Vybrant SE CMFDA Farbstoff, besitzen einen Succinimidylester als reaktive Gruppe. Intrazellulär reagieren diese Substanzen unter Ausbildung einer Peptidbindung mit Aminogruppen von Proteinen. Auch dieses Produkt ist fixierbar. Um das Umgebungsmedium möglichst proteinfrei zu bekommen wird die Anzahl der Waschschriffe auf drei erhöht. Trotzdem ist für Anwendungen der TIRF-Mikroskopie zu berücksichtigen, dass die Proteinschicht, die aus dem Medium auf den Glasboden absorbiert, einen erhöhten und unregelmäßigen Hintergrund hervorrufen kann. Im Gegensatz zu den Calceinfarbstoffen, die direkt nach dem Färben einsetzbar sind, benötigen die fixierbaren Farbstoffe noch mindestens eine Stunde Reaktionszeit, in der die intrazellulären Bindungen ausgebildet werden.

Um fixierte Präparate zu erhalten, wurden die Zellen drei Mal mit warmem PBS gewaschen und mit 4 Prozent Paraformaldehydlösung für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Fixierung wurde überschüssiges Paraformaldehyd abgewaschen (3 Mal PBS) und die Zellen zur Färbung eingesetzt. Zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts wurde ein fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin, das bitykliche, giftige Heptapeptid des Grünen Knollenblätterpilzes gewählt (Wulf et al. 1979). Phalloidin interkaliert in die Spalte, die normalerweise das Nukleotid und das zweiwertige Kation bindet, und stabilisiert die filamentöse Form des Aktins (Otterbein et al. 2001). Die Färbung von Zellkernen erfolgte mit 4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI), einem Fluoreszenzmarker, der in die AT reichen Regionen der DNA interkaliert (Dolezel et al. 1992). Aktive Zelladhäsionen wurden an Hand der Fokalen Adhäsions Kinase (FAK) mittels Antikörperfärbung identifiziert.

Die genauen Protokolle mit Konzentration, Wasch- und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

<b>Farbstoff / Antikörper</b>	<b><math>\lambda Ex_{max}</math> [nm]</b>	<b><math>\lambda Em_{max}</math> [nm]</b>	<b>Medium</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Waschen vorher</b>	<b>Waschen nachher</b>
Anti Maus FAK	---	---	PBS + 2 % BSA	1,25 $\mu$ g / ml	60 min, 4 °C	60 min, PBS + 2 % BSA	3x PBS + 0,1 % Tween, 5 min
Anti Maus IgG	490	508	PBS + 2 % BSA	30 $\mu$ g / ml	60 min, 4 °C	10 min, PBS + 2 % BSA	3x PBS + 0,1 % Tween, 5 min
Calcein	495	514	Calcein-puffer (-Ca <sup>2+</sup> )	10 $\mu$ g / ml	15 min, 37 °C	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )
Calcein Red Orange	575	591	Calcein-puffer	10 $\mu$ g / ml	15 min, 37 °C	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )
DAPI	358	461	PBS	0,1 $\mu$ g / ml	5 min, RT	1x PBS	2x PBS, 5 min
Dihydro-calcein	495	514	Calcein-puffer (-Ca <sup>2+</sup> )	10 $\mu$ g / ml	15 min, 37 °C	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )	1x Calcein-puffer (+Ca <sup>2+</sup> )
Calceine Langzeit	---	---	Medium	1 $\mu$ g / ml	Permanent	1x Medium	---
Phalloidin Alexa Fluor 546	546	573	PBS	0,2 $\mu$ g / ml (3U)	60 min, 4 °C	1x PBS	2x PBS, 5 min
Vybrant SE CMFDA	492	517	Medium ohne FCS	5,6 $\mu$ g / ml	15 min, 4 °C	3x PBS	3x PBS

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Farbstoffe, sowie deren spektrale Daten und die eingesetzten Protokolle.

#### 4.2.3.2 Lebend-Fluoreszenzmarker

Um Zeitrasterstudien von Proteinen des Zytoskeletts durchführen zu können, muss aus einem Fluoreszenzmarker und dem gewünschten Targetprotein ein Fusionsprotein hergestellt werden. Dazu werden die Targetproteine und die Fluoreszenzmarker in einem Plasmid zusammenkloniert und anschließend in eukaryotische Zellen mittels Lipofektion (Felgner et al. 1987) transformiert. Dort werden die prokaryotischen Plasmide mit Hilfe eines viralen Promotors exprimiert.



Hier kamen zwei Fluoreszenzmarker zum Einsatz: pEGFP („enhanced“ grün fluoreszierendes Protein,) und pDsRed2-C1 (*Discosoma* rot fluoreszierendes Protein). Bei EGFP handelt es sich um eine rotverschobene ( $\lambda_{\text{Abs}_{\text{max}}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}_{\text{max}}} = 507 \text{ nm}$ ) Mutante (Cormack et al. 1996) des aus *Aequorea victoria* isolierten Wildtyp-GFP (Shimomura et al. 1962). GFP und seine spektral ähnlichen Mutanten haben sich zu dem meistgenutzten Reportersystem in allen Bereichen der Biotechnologie entwickelt (Misteli und Spector 1997). Allerdings ist manchmal ein zweiter Marker, möglichst mit einer deutlich anderen spektralen Charakteristik von Nöten. In diesem Falle wurde zusätzlich ein reines pDsRed2-C1-Plasmid verwandt. Damit konnten die Zellen zytosolisch gefärbt werden, so dass die Beobachtung der Adhäsionsmuster über längere Zeiträume möglich wurde. DsRed wurde ursprünglich aus der Blauscheibenanemone *Discosoma spec* isoliert (Matz et al. 1999). Dieses Fluorophor benötigt allerdings 3 bis 4 Tage zur Reifung, was die Anwendungsmöglichkeiten in der Biotechnologie deutlich schmälert. Daher stellten Bevis et al. eine Reihe von Mutanten her (Bevis und Glick 2002). Bei DsRed2 gelang es durch den Austausch von sechs Aminosäuren eine schnellere Reifung, bereits innerhalb von 24 Stunden, zu erhalten. Das Fluorophor wird bei  $\lambda = 558 \text{ nm}$  angeregt und emittiert bei  $\lambda = 583 \text{ nm}$  maximal.

Die gekauften Plasmide wurden in *E.coli* Top 10 nach den Standardprotokollen vermehrt und mittels eines Plasmidisolationskits aufgereinigt.

Nach dem folgenden Protokoll vergehen zwischen Aussaat der Zellen und Start der mikroskopischen Beobachtung 4 Tage, statt normalerweise 2 Tage (s. 4.2.1). Da die Zellen im Präparat noch die Möglichkeit zur Migration haben sollen und die Zelldichte in allen Präparaten konstant bleiben soll, müsste die Zellzahl zur Aussaat entsprechend geviertelt werden. Im Gegenzug belastet die Transfektion die Zellen und führt zu einer Verlangsamung der Zellteilung. Eine Zellzahl von  $5 \times 10^2 \text{ Zellen / cm}^2$  führte zu den gewünschten Ergebnissen und wurde daher für die Transfektionsexperimente gewählt.

Nach 2 Tagen Wachstum in der NUNC-Kammer wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurde serumfreies Medium mit zusätzlich 2 mM L-Glutamin hergestellt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Parallel dazu wurden 4,5 Mikrogramm DNA (pEGFP-Aktin-DNA und pDsRed2-C1-DNA, und 12 Mikroliter Optifect Reagenz in je 500 Mikroliter serumfreiem Medium aufgenommen und bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach 5 Minuten wurden die Lösungen vereinigt und für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Diese Mischung wurde auf 2 Milliliter aufgefüllt und für 24 Stunden auf die Zellen gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift (1-mal PBS) und 24 Stunden Regenerationszeit in Vollmedium wurden die Zellen für die Mikroskopie eingesetzt. Nach 48 Stunden war auch der Auffaltungsprozess der Proteine abgeschlossen, so dass die gewünschten Strukturen beobachtet werden konnten. Da auch bei längeren Zeitrasterstudien keine morphologische Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, die Teilungsraten wieder normal waren und auch die C2C12-Muskelzellen noch in der Lage

waren zu differenzieren, wurde das Zellverhalten als normal und mit untransfizierten Zellen vergleichbar angesehen.

Um zu Überprüfen, ob die transfizierten Proteine wie die endogenen Analoga von der Zelle verwendet werden, wurden pEGFP-Aktin-transfizierten Zellen mit Phalloidin gegengefärbt. Es konnten keinerlei Unterschiede zwischen der Verwendung des endogenen und des GFP-markierten Aktins festgestellt werden.

### 4.2.4 Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie

Die Wahl der mikroskopischen Beobachtungstechnik ergibt sich aus der Lokalisation der zu untersuchenden Ereignisse. Da diese am Übergang vom Substrat zur Zelle lokalisiert sind, wurde die Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF-) Mikroskopie gewählt. Dabei handelt es sich um ein Fluoreszenz-Mikroskopieverfahren, bei dem die Anregung des Präparates durch ein bei Totalreflexion entstehendes evaneszentes Feld erfolgt. Da die Intensität dieses Feldes vom Substrat weg exponentiell abfällt, erhält man nur eine sehr geringe Eindringtiefe in das Präparat. Dadurch ergibt sich eine bis zu zehnfach bessere Diskriminierung in z-Richtung, als sie z. B. mit einem „Confocal Laser Scanning“ (CLS-) Mikroskop erreicht wird. Abbildung 4 zeigt den Anregungsbereich einer Zelle durch ein evaneszentes Feld.

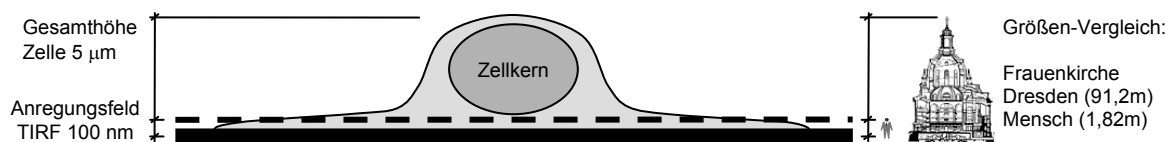


Abbildung 4: Darstellung des Anregungsbereiches durch ein evaneszentes Feld bei der TIRF-Mikroskopie.

Die Diskriminierung in z-Richtung führt dazu, dass weiter im Zellinneren liegende Fluorophore nicht angeregt werden, sondern eine Fokussierung auf den substratnahen Bereich stattfindet. Daher zeichnet sich die TIRF-Mikroskopie durch die exklusive Abbildung der substratnahen Strukturen und durch ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aus.

Die TIRF-Mikroskopie gewinnt in den Biowissenschaften immer mehr an Bedeutung. Die enormen Vorteile zur Beobachtung substratnaher Phänomene, können seit der Entwicklung von TIRF-fähigen Objektiven leichter genutzt werden. Weitere geeignete Bereiche für die Anwendung der TIRF-Mikroskopie sind Vesikelfusionen mit der Zellmembran, wie sie bei der Exozytose vorkommen, oder Einzelmolekülstudien, wie die Umsetzung des ATP durch Myosin (Toomre und Manstein 2001). Im Folgenden werden kurz die grundlegenden Prinzipien dargestellt, wobei anschließend genauer auf den experimentellen Aufbau eingegangen wird.

Tritt ein Lichtstrahl aus einem optisch dichteren Medium (z. B. Glas) in ein optisch dünneres Medium (z. B. Wasser) über, so wird er gemäß des Snellius'schen Gesetzes gebrochen.

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

wobei  $\alpha_1$ , der Einfallswinkel des eintreffenden Lichtstrahls,  $\alpha_2$  der Austrittswinkel des gebrochenen Lichtstrahls und  $n$  die Brechungsindices der Medien beschreibt. Ist  $n_2$  (Wasser)  $<$   $n_1$  (Glas), so wird der Lichtstrahl vom Lot weg gebrochen. Dieser Effekt wird umso größer, je größer der Einfallswinkel  $\alpha$  ist. Für den Grenzfall, dass das austretende Licht parallel zur Phasengrenze verläuft, ergibt sich der Einfallswinkel aus dem Quotienten der beiden Brechungsindices gemäß:

$$\sin \alpha_T = \frac{n_2}{n_1} \cdot \sin 90^\circ = \frac{n_2}{n_1}$$

Da das Licht in das optisch dünnere Medium nicht mehr eintreten kann, sondern an der Grenzfläche vollständig reflektiert wird, wird der Winkel  $\alpha_T$  als kritischer Winkel der Totalreflexion bezeichnet. Im Falle von Borosilikatglas und dem Zytosol einer Zelle ( $n_2 = 1,358-1,374$ ) (Lanni et al. 1985) beträgt der Winkel, ab dem Totalreflexion erreicht wird, bei Anregung von Licht mit der Wellenlänge 488 Nanometer ( $n_{1\text{Glas}} = 1,524$ ) zwischen 63,0 und 64,3 Grad und bei Anregung von Licht mit der Wellenlänge 546 Nanometer ( $n_{1\text{Glas}} = 1,519$ ) zwischen 63,4 und 64,8 Grad.

Die klassische Elektrodynamik erlaubt es allerdings nicht, dass sich eine elektromagnetische Welle diskontinuierlich verhält und einfach verschwindet (Steyer und Almers 2001). Daher entsteht an der Grenzfläche ein so genanntes „evaneszentes Feld“, das in das optisch dünnere Medium eindringen kann. Abbildung 5 zeigt diese Situation schematisch.

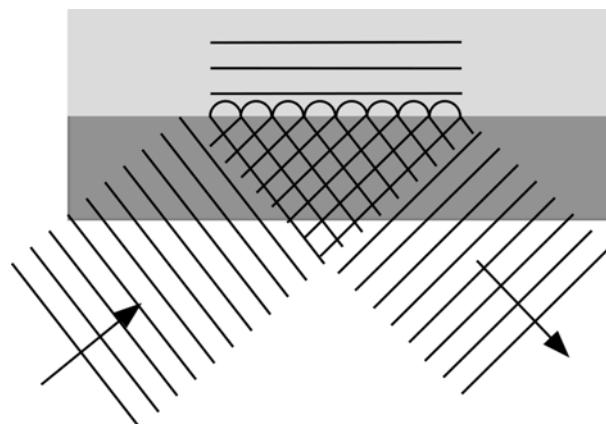


Abbildung 5: Schematische Darstellung des evaneszenten Feldes, das sich bei Totalreflexion ausbildet.

Das evaneszente Feld hat dieselbe Frequenz wie das totalreflektierte Licht (Axelrod 2001), besitzt allerdings keine reelle Ausbreitung mehr, sondern fällt in der Intensität von der Grenzfläche her exponentiell ab (Axelrod 1981). Die Intensität des evaneszenten Feldes kann im Abstand  $z$  von der Grenzfläche wie folgt berechnet werden.

$$I_z = I_0 \cdot \exp\left(-z/d_p\right)$$

Dabei ist die theoretische Eindringtiefe  $d_p$  des evaneszenten Feldes als der Wert definiert, bei dem die Ursprungsintensität  $I_0$  auf  $I_0 / e$  abgefallen ist. Die theoretische Eindringtiefe hängt von der Wellenlänge  $\lambda$  und dem Einfallswinkel des verwendeten Lichts sowie den beiden Brechungsindizes  $n_1$  und  $n_2$  der Medien ab.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \alpha_1 - n_2^2}}$$

Die in der Standardanwendung erreichten Eindringtiefen liegen bei ungefähr 100 Nanometern. Damit erreicht die TIRF-Mikroskopie eine deutlich höhere Diskriminierung in  $z$ -Richtung als die CLS-Mikroskopie. Zudem erhält man neben einem guten Signal-Rauschverhältnis auch eine Minimierung der lichtinduzierten Zellschäden und des Ausbleichens der Probe gegenüber Standardfluoreszenztechniken.

Zum Erhalt eines TIRF-Feldes wurden im Zusammenhang mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur (PlanAPO60xOil TIRFM) zwei verschiedene Aufbauten eingesetzt. Für fixierte, einfarbige Präparate wurden ein Argonlaser und der entsprechende Laser-TIRF-Kondensor (IX2-RFAEVA) eingesetzt. In Kombination mit der Inkubationskammer und für Mehrfarb-TIRF-Anwendungen wurde die TIRF-Beleuchtung mit einer Quecksilberdampfampe (U-LH100HG) und den Filtersets U-MNIBA2 (Exciter: BP 470 - 490 nm, Dichroid: LP 505 nm, Emitter: BP 510 - 550 nm) und U-N41002 (Exciter: BP 510 - 560 nm, Dichroid: LP 565 nm, Emitter: BP 572,5 - 647,5 nm) realisiert. Dazu wurde der "L-shape" Kondensor (IX2-RFAL) mit dem TIRF-„set-up“ (IX2-ARCEVA) ausgerüstet.

Da TIRF-Beleuchtung mit einer Quecksilberlampe ungewöhnlich ist, soll im Folgenden kurz der Strahlengang erläutert werden: Direkt hinter der Kollimatorlinse der Quecksilberlampe ist der Erregerfilter positioniert und filtert die gewünschten Wellenlängen aus. Dann wird das Licht über einen Keil in die Randbereiche der Kondensoroptik verschoben und wird dort durch eine halbmondförmige Blende beschnitten, damit nur die Randbereiche der Beleuchtung zur Anregung benutzt werden können. Dieses Blendenbild wird in die hintere Fokusebene des Objektivs projiziert. Das Anregungslicht durchläuft dann axenfern das Objektiv und der austretende Strahl wird auf Grund der hohen NA total reflektiert. Bei Einsatz eines Lasers als Anregungsquelle muss der Laserstrahl ebenfalls so eingekoppelt werden, dass er entfernt von der optischen Achse im Randbereich des Objektivs auf die Frontlinse trifft, wo er dann beim Austritt

ebenfalls total reflektiert wird. Abbildung 6 zeigt den Strahlengang für beide Anregungsmöglichkeiten und das austretende evaneszente Feld.

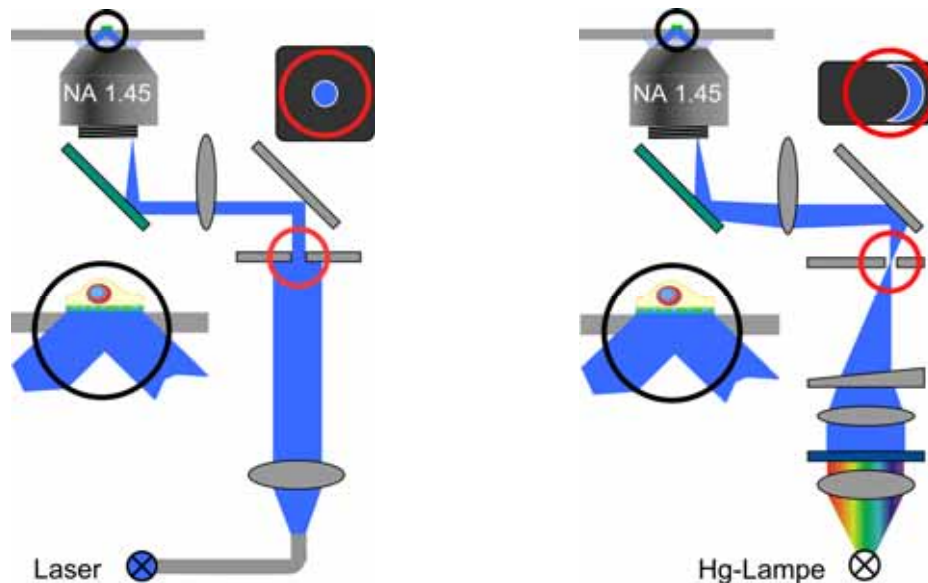


Abbildung 6: Strahlengang des TIRF-Aufbaus mit Laser- und Lampenanregung

#### **4.2.4.1 Bildaufnahme**

Die Bildaufnahme erfolgte mittels einer Peltier gekühlten CCD Kamera und openlab Software. Für Zeitrafferaufnahmen im RC-Durchlichtverfahren wurde die programminterne Routine eingesetzt. Die Bildabstände wurden dem Experiment entsprechend gewählt. Zur Aufnahme von Zeitrafferserien im TIRF-Modus wurde zusätzlich ein automatisches Verschlussystem (Uniblitz VMM-T1 „Shutter / Driver / Timer“) vor die Lampe geschaltet. Dadurch konnte der Stress für die Zellen durch die Bestrahlung mit hochenergetischem Licht minimiert werden. Die Synchronisation von Verschlussystem und Bildaufnahme wurde durch eine Verbindung zwischen Shutter und Rechnertastatur realisiert. Die Bildaufnahme erfolgte standardmäßig mit einer Belichtungszeit von 400 Millisekunden und einer halbmaximalen Detektorverstärkung.

#### **4.2.4.2 Zeitserien**

An die Aufnahme von Zeitserien über lange Zeiträume werden experimentell hohe Anforderungen gestellt. Dabei müssen zum einen die Umgebungsbedingungen für die Zellen möglichst konstant und physiologisch gehalten werden, zum anderen ergeben sich aus der Klimatisierung des Aufbaus Probleme mit der Fokusstabilität bei hochauflösenden Mikroskopietechniken.

Für Aufnahmen von Zeitserien wurde ein IX-71-Mikroskop mit einer Inkubationskammer ausgestattet. Dadurch konnten Temperatur (37 °C), CO<sub>2</sub>-Konzentration (5 Prozent) und Luftfeuchtigkeit (65 Prozent) den Kulturbedingungen in einem Brutschrank angepasst werden. Im Gegensatz zum Brutschrank sind allerdings bei einer Inkubationskammer die

Außenwände nicht isoliert, so dass sich über die Kammer ein Temperaturgradient einstellt. Zusätzlich befindet sich das Mikroskopstativ teilweise außerhalb der beheizten Kammer, so dass auch dort ein Temperaturgradient zu erwarten ist. Das hat die folgenden Konsequenzen.

Zum einen darf die Luftfeuchtigkeit 65 Prozent nicht überschreiten, da sich sonst an den kältesten Stellen Kondenswasser bildet, das in das Mikroskop fließen kann. Zum zweiten können sich durch die Temperaturgradienten Auswirkungen auf die Fokusstabilität ergeben. Der durch die geringere Luftfeuchtigkeit aufgetretene Medienverlust in den Präparaten wurde durch Abdecken der Präparate minimiert und durch adäquate Mengen an ddH<sub>2</sub>O bei mehreren Versuchstagen ausgeglichen. Bei gering vergrößernden Objektiven (10fach-RC) konnte die Problematik der Fokusschwankungen vernachlässigt werden. Sollte allerdings ein Bild im TIRF-Feld unter der hohen Vergrößerung (63fach TIRFM) konstant gehalten werden, musste der Mikroskopaufbau modifiziert werden.

Ein derzeit auf dem Markt befindlicher Software-Autofokus ist nicht hilfreich, da auf Grund der Zytotoxizität längerer Zellbestrahlung die Beleuchtungszeit gering gehalten werden muss. Zudem ist es nicht sinnvoll auf der Beobachtungsstelle per Software nach zu fokussieren, da sich dabei an den Fluorophoren bis zur eigentlichen Bildaufnahme Bleicheffekte einstellen. Ein Ausweg aus diesem Problem wäre ein Hardware-Autofokus, der mittels einer Laserdiode über die Reflexion am Glassubstrat die Präparatlage bestimmt. Zur Zeit der Bildaufnahme war bei keinem Mikroskophersteller ein solches System verfügbar. Inzwischen hat Olympus allerdings ein Hardware-Autofokus-System entwickelt, das demnächst auf dem Markt sein wird und für derartige Probleme zukünftig zur Verfügung stehen wird. Indes ist auch eine rein mechanische Lösung für das beschriebene Problem möglich. Der Mikroskoptisch wurde im Endeffekt durch eine „nose piece stage“ (Prototyp) ersetzt. Da dieser Tisch im Objektivrevolver anstatt am Stativ befestigt wird und das Objektiv aufnimmt, werden Mikroskoptisch und Objektiv mechanisch und thermisch gekoppelt. Der Präparateteller sitzt wie ein Deckel auf dem Tischgehäuse und wird magnetisch gehalten. Die Fokusslage wird durch ein Feingewinde manuell geregelt. Mit Hilfe dieser Konstruktion ließen sich auch im TIRF-Modus stabile Fokuslagen über Tage realisieren.

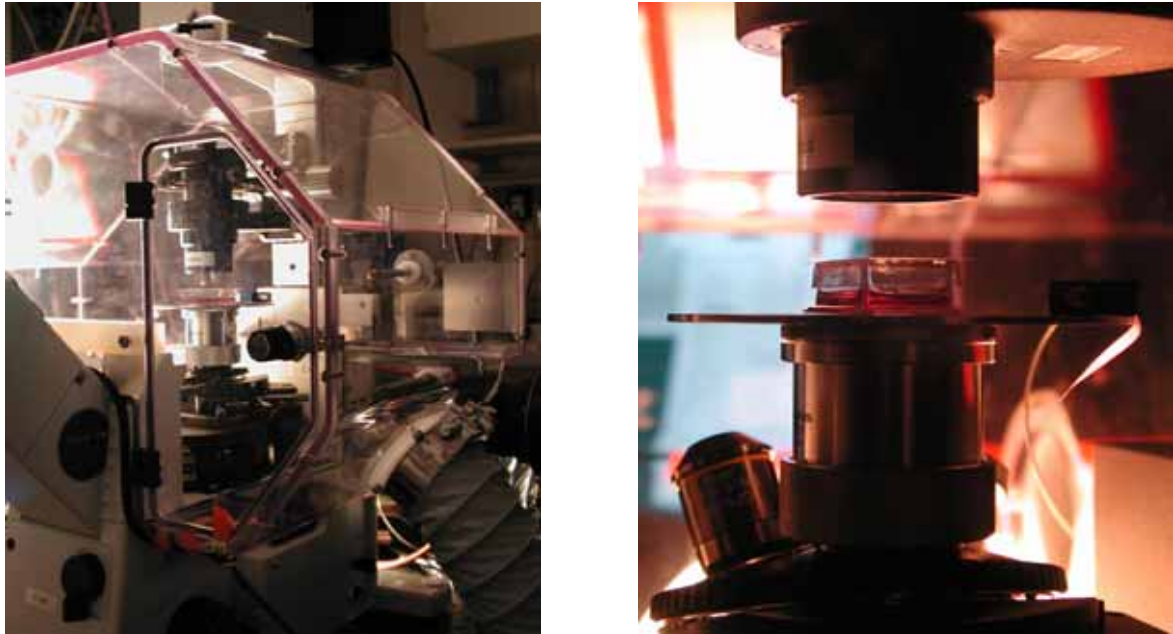


Abbildung 7: IX-71-Mikroskop mit Inkubationskammer unter Verwendung der „nose piece stage“ (links). Präparat auf der „nose piece stage“ in der Vergrößerung (rechts)

Zur Steuerung der Inkubationskammer wurde vom Hersteller ein Programm zur Verfügung gestellt, das von einem separaten Rechner aus gesteuert wird. Bei Ölimmersionsobjektiven muss berücksichtigt werden, dass der Brechungsindex temperaturabhängig ist. Daher wurde ein Spezialöl eingesetzt, das bei 37 °C einen Brechungsindex von  $n = 1,514$  hat (Cargille, Type 37). Unter diesen Bedingungen konnten die Zellen mehrere Tage kultiviert und beobachtet werden. Dabei wurden weder Veränderungen in der Teilungsrate noch morphologische Auffälligkeiten beobachtet und C2C12-Muskelzellen waren noch in der Lage zu differenzieren. Daher wurde das Zellverhalten als normal und mit Experimenten aus dem Zellinkubator vergleichbar angesehen.

#### **4.2.4.3 Bildverarbeitung**

Die aufgenommenen Bilder wurden aus dem programminternen Formatstandard in das gebräuchliche tif-Format konvertiert und dann mit ImageJ-Software weiterverarbeitet. Um Intensitätsschwankungen, beispielsweise verursacht durch Helligkeitsinhomogenitäten der Lampe, auszugleichen, wurde bei TIRF-Zeitserien die Fluoreszenzintensität in allen Bildern maximal ausgesteuert und angeglichen (0 = Hintergrund und 255 = maximales Zellsignal). Zur Auswertung von Bildern aus Zeitserien wurde eine Farbcodierung eingesetzt. Dazu wurden drei aufeinander folgende Grauwertbilder (z. B. Zeitpunkte -30, -15 und 0 Minuten) zu einem RGB-Bild verschmolzen. Dabei repräsentieren die drei Farben blau, grün und rot die Fluoreszenzintensität an den drei Zeitpunkten  $t = -30$ ,  $t = -15$  und  $t = 0$  Minuten. Dieser Vorgang wurde mit allen Bildern einer Zeitserie wie folgt wiederholt:  $b/g/r = 1/2/3, 2/3/4, 3/4/5 \dots n-2/n-1/n$ .

#### **4.2.5 „Confocal Laser Scanning“-Mikroskopie (CLSM)**

Bei der Mikroskopie von strukturierten Oberflächen kommt es beim Einsatz der TIRF-Mikroskopie zu Problemen. Die Grenzfläche, an der das evaneszente Feld entsteht, besteht nicht mehr nur aus Glas, sondern ist streckenweise mit zwei Metallschichten bedampft. Auf Grund der Stärke der Metallschichten sind diese lichtundurchlässig. Daher kann die Reaktion der Zellen auf die Oberflächen nicht mehr beobachtet werden, da sie von unten nicht mehr beleuchtet werden. Somit wurde für die strukturierten Präparate das CLS-Mikroskop zur Detektion eingesetzt. Da CLS-Mikroskopie inzwischen zu den Standardtechniken gehört, wird die Funktionsweise nur kurz beschrieben.

Das CLS-Mikroskop bietet eine Möglichkeit sehr hochaufgelöste Bilder in Form von optischen Schnitten in allen Ebenen eines Präparates zu machen, da nur das Licht aus dem Fokuspunkt der Bildebene zur Bildentstehung verwendet wird. Zentrales Element des konfokalen Prinzips sind zwei Lochblenden, die in einer Bildebene mit dem Fokuspunkt liegen (konfokal) und Streulicht aus den umgebenen Ebenen abschneiden (Minsky 1957). Da immer nur ein Fokuspunkt betrachtet wird, muss zur Bildentstehung der Fokuspunkt das Bild abrastern bzw. „scannen“. Das zur Fluoreszenzanregung eingesetzte Laserlicht wird durch den Hauptfarbteiler auf das Präparat fokussiert. Der Fokuspunkt wird über galvanisch betriebene Spiegel durch die Probe bewegt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird anschließend durch das Detektor-„Pinhol“ beschnitten und mit Photomultipliern detektiert (Földes-Papp et al. 2003).

Bei den Experimenten wurden die folgenden Einstellungen verwandt: zur Anregung wurden der Diodenlaser (405 nm), der Argon-Laser (488 nm) und der Helium-Neon-Laser 1 (543 nm) eingesetzt. Ferner kamen die folgenden Filtersätze zum Einsatz: der Hauptfarbteiler (HFT) HFT 405/488/543 wurde mit den NebenfARBteilern (NFT) NFT 545 und NFT 490 kombiniert.

Als Detektionsfilter wurden zwei Bandpass-Filter (BP) BP 420-480 und BP 505-530 und ein Langpass-Filter LP > 560 nm gewählt. Die Auflösung betrug 1024x1024 Pixel, was einer Bildbreite von 123 Mikrometern entspricht.

#### **4.2.6 Strukturierung von Oberflächen**

An die strukturierten Oberflächen wurden verschiedene Anforderungen gestellt. Als Basis wurden die Standardglassubstrate gewählt. Dadurch ist zum einen die Vergleichbarkeit gewährleistet und zum anderen sind die Präparate lichtmikroskopisch analysierbar. Für den gewünschten Größenbereich von 100 Nanometern bis einigen Mikrometern lateraler Ausdehnung eignen sich Metallstrukturen, die im Elektronenstrahl-Lithographieverfahren hergestellt werden können. Dabei ist die Höhe der Strukturen frei wählbar. Um die Oberfläche weiter modifizieren zu können wurde für die Strukturierung Gold gewählt. Dadurch steht über die Möglichkeit einer Thiol-Goldbindung eine Oberflächenchemie zur



Verfügung, die die Strukturen beliebig modifizieren kann. Prinzipiell ist auch eine weitere Modifikation der Glasoberfläche möglich.

#### 4.2.6.1 Elektronenstrahl-Lithographie

Die Herstellung der Strukturen erfolgte beim Kooperationspartner NaWoTec GmbH. Da es sich bei der Elektronenstrahl-Lithographie um einen technisch anspruchsvollen Vorgang handelt, soll kurz der Ablauf der Herstellung umrissen werden.

Auf gereinigte Glasoberflächen wird eine Metallbasisschicht (10 nm) aus Titan oder Crom aufgedampft, da für die Elektronenstrahl-Lithographie eine leitende Oberfläche nötig ist, die die entstehenden Ladungen ableitet. Anschließend wird ein Photolack auf die Basisschicht aufgebracht. Die Belichtung erfolgt unter Einsatz eines Elektronenstrahls. Dadurch können beliebige Muster in den Lack geschrieben werden. Anschließend werden die belichteten Teile des Lacks chemisch entfernt und eine Haftschrift aus Titan (10 nm) und die Goldschicht in der gewünschten Höhe (60 nm) aufgedampft. Ein Haftvermittler ist nötig, da Gold selbst nicht beständig an Glas bindet. In den belichteten Bereichen liegt das Gold jetzt direkt auf dem Titan und bildet die gewünschten Strukturen. Mit der chemischen Entfernung des nicht belichteten Lacks verschwindet gleichzeitig das Gold in den Zwischenräumen. Anschließend wurde die Basisschicht wieder entfernt, damit das Präparat lichtmikroskopisch zugänglich ist. Das Ätzen einer Titanbasisschicht kann beispielsweise mit konzentrierter Schwefelsäure bei 150 °C erfolgen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der gesamte Prozess in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

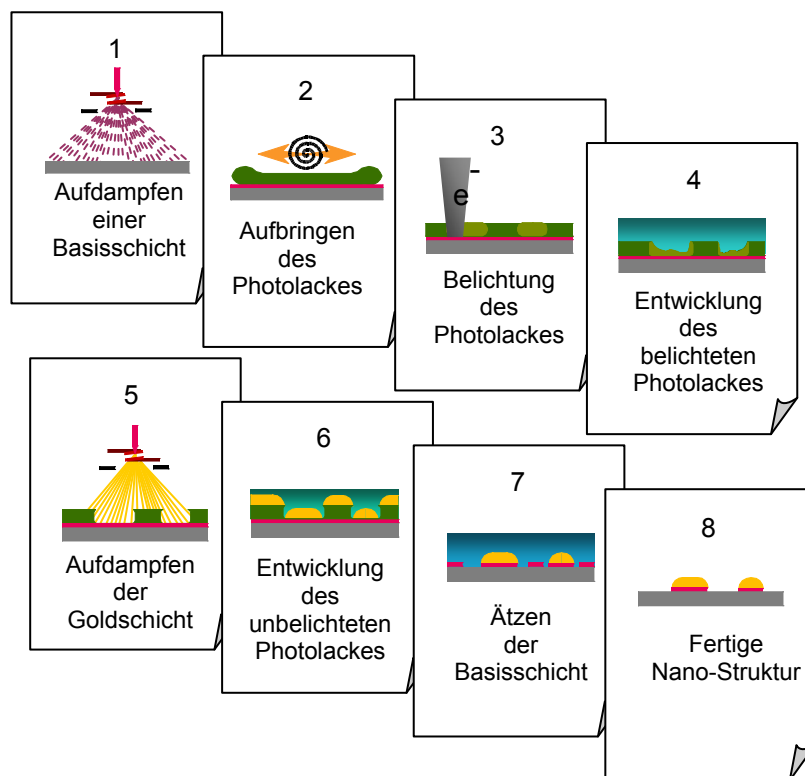


Abbildung 8: Schematische Darstellung der einzelnen Prozessschritte bei der Strukturherstellung

Die vom Projektpartner hergestellten Strukturen zeichneten sich durch eine hohe Qualität und eine große Steilheit der Strukturkanten aus. Alle Substrate waren zellverträglich und die Haftung auf dem Glassubstrat wurde durch die Zellkultivierung nicht beeinträchtigt. Abbildung 9 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Winkelstrukturen.

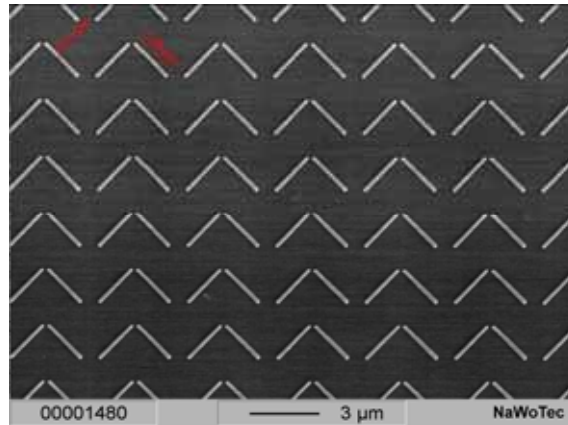


Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Beispielstruktur, hier Titanwinkel.

## 5 Ergebnisse

Mit Hilfe der Langzeit-TIRF-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die ventrale Zellmembran von adhärenenten Zellen eine zellspezifische Strukturierung aufweist. Diese Strukturierung steht mit dem Adhäsionsverhalten der Zellen im Zusammenhang und hat ebenfalls Auswirkungen auf die Migration der Zellen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Adhäsionsmuster auf die Bildung von Zellspuren Einfluss haben. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Zellspurmorphologie und dem Adhäsionsmuster der Zellen. Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden zwei Fibroblastenzelllinien (L929 und 3T3) sowie eine Muskelzelllinie (C2C12) und eine Epithelzelllinie (CHO) gewählt, die ein weit gefächertes Migrationsverhalten zeigen und teilweise bereits mit Zellspurbildung in Verbindung gebracht werden konnten.

### 5.1 Dynamik des Migrationsverhaltens

Für die technische Nutzung der Zellspuranalyse ist es wichtig, den Zusammenhang zwischen der Zellspurentstehung und der Migration der Donorzelle zu verstehen und zu beeinflussen. Daher wurde das physiologische Migrationsverhalten der Zelllinien in In-vitro-Kultur untersucht. Zur Charakterisierung der Dynamik wurden von vier Zelllinien mit unterschiedlichem Migrationsverhalten Zeitrafferaufnahmen im Relief-Contrast (RC-) Durchlichtverfahren aufgenommen. Die Bildserien wurden mit Hilfe von Trajektorien ausgewertet. Die Trajektorien dienen als Grundlage zur Analyse des Migrationswegs der einzelnen Zellen und zeichnen den Weg einer Zelle bis zur nächsten Zellteilung nach.

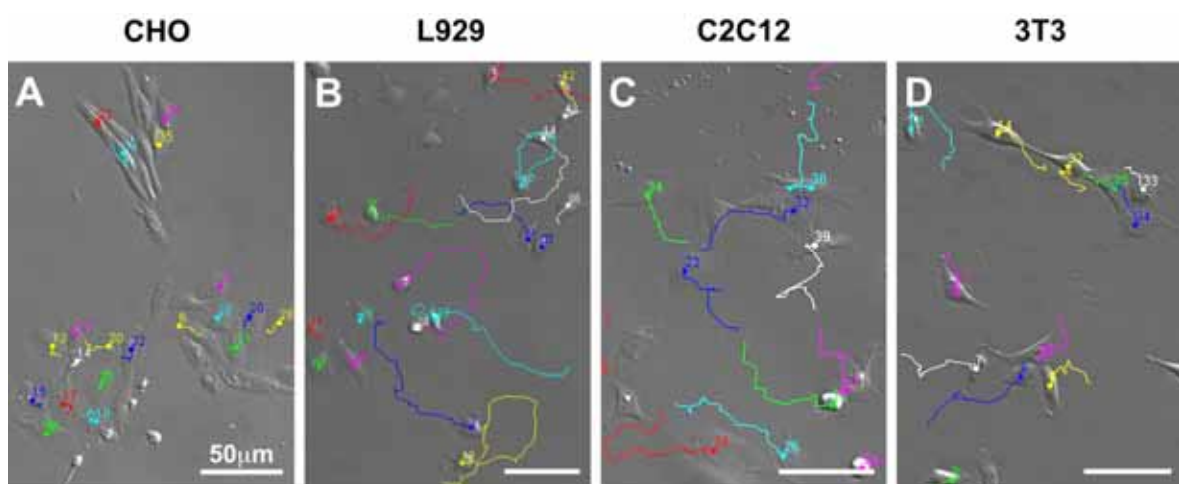


Abbildung 10: Migrationstrajektorien aus Zeitrafferaufnahmen im RC-Durchlichtverfahren der vier untersuchten Zelllinien. Der Beobachtungszeitraum betrug 60 Stunden, der Zeitabstand zwischen den Einzelbildern 10 Minuten. Die Trajektorien verfolgen jeweils den Wanderungsweg einer Zelle bis zur nächsten Zellteilung. A: CHO-Zellen wachsen in kleinen Gruppen und migrieren nicht. B: L929-Zellen migrieren über große Strecken und bleiben dabei vereinzelt. C: C2C12-Zellen legen kürzere Strecken zurück und tendieren zur Bildung kleiner Gruppen.

D: 3T3-Zellen migrieren ähnlich wie C2C12-Zellen. Die Zellen einer Gruppe bewegen sich gemeinsam.

Das unstimulierte Migrationsverhalten der verschiedenen Zelllinien in In-vitro-Kultur weist deutliche Unterschiede auf. Dabei ist das Verhalten nicht von der Zelldichte abhängig, sondern die beschriebenen Prinzipien sind von Beginn kurz nach der Aussaat bis zum Erreichen der Konfluenz zu beobachten.

Die CHO-Epithelzelllinie zeigt kein ausgeprägtes Wanderungsverhalten (Abbildung 10 A). Die Zellen adhären in kleinen Gruppen und haben Kontakt zu ihren Nachbarn. Die Gruppen bleiben weitgehend unverändert und werden durch Zellteilung langsam größer, bis sie aufeinander stoßen und eine geschlossene Schicht bilden. Die Trajektorien zeigen nur minimale Bewegungen ohne Vorzugsrichtung an.

Im Gegensatz dazu vermeiden L929-Fibroblasten Kontakt zu Nachbarzellen und sind sehr mobil (Abbildung 10 B). Die Trajektorien zeigen lange Wegstrecken an, die voneinander unabhängig verlaufen. Zellen, die sich während der Migration begegnen, ändern ihre Laufrichtung bzw. umrunden einander (B, unten: blau (1) und gelb (13)). Nach einer Zellteilung wandern die beiden Tochterzellen in entgegengesetzter Richtung davon (Mitte rechts; weiß (36) und blau (37)). Dieses Verhalten bleibt erhalten, bis die Zellen zur Konfluenz aufgewachsen sind. Dabei verteilen sich die Zellen die ganze Zeit optimal über die zur Verfügung stehende Fläche und vermeiden den direkten Zell-Zell-Kontakt.

C2C12- und 3T3-Zellen weisen eine Mischung aus den bereits beschriebenen Verhaltensformen auf. Beide Zelltypen sind mobil, neigen aber trotzdem dazu Zell-Zell-Kontakte aufzubauen und kleine Gruppen zu bilden. An den Trajektorien erkennt man, dass die Zellen direkt aufeinander zu gelaufen sind. Drei C2C12- und vier 3T3-Zellen bilden jeweils eine Zellgruppe (Abbildung 10 C oben rechts, C2C12: weiß (39), blau (33) und türkis (36); D unten rechts, 3T3: pink (5), gelb (6), blau (8) und weiß (7)). Bestehende Gruppen bewegen sich gemeinsam, so dass die Trajektorien parallel verlaufen (D oben rechts, 3T3: blau (34), grün (35) und gelb (32)). Wenn sich Zellen von Gruppen lösen, bleiben die Zell-Zell-Kontakte bestehen, so dass sich lange Ausläufer bilden (D oben rechts, 3T3: gelb (32) und gelb (14)). Treffen Zellen zufällig aufeinander, verläuft die Migrationsrichtung anschließend parallel (C unten links, C2C12: türkis (25), grün (23) und lila (27)).

Insgesamt erscheint die Bewegung der C2C12- und der 3T3-Zellen gleichmäßiger als die der L929-Zellen. Das könnte sowohl durch unterschiedliche Migrationsmechanismen als auch durch Spannungen verursacht werden, die vermutlich entstehen, wenn sich Zellen einer Gruppe in entgegengesetzte Richtungen bewegen.

## **5.2 Charakterisierung der Adhäsion**

Nachdem ein unterschiedliches Migrationsverhalten bei den Zellen festgestellt wurde, wird darauf aufbauend die Adhäsion der Zellen untersucht, unter der Prämisse, dass die Adhäsion Einfluss auf die Zellspurentstehung hat. Dazu wurden die Zellen mit dem zytosolischen Farbstoff Calcein gefärbt. Bei Calcein handelt es sich um einen nicht zytotoxischen Volumenmarker, der frei löslich im Zytosol der Zellen vorliegt. Dadurch wird die gesamte Zelle gleichmäßig gefärbt. Diese Färbung ermöglicht es lebende Zellen direkt zu untersuchen, so dass nicht mit der Ausbildung von Artefakten durch eine Fixierung gerechnet werden muss.

In Kombination mit der TIRF-Mikroskopie ist es möglich eine Strukturierung der Kontaktfläche der Zelle zum Substrat selektiv zu analysieren. Auf Grund des exponentiell abfallenden Anregungsfeldes erscheinen glasnahe Bereiche heller als solche, die weiter entfernt sind. Strukturen in der ventralen Zellmembran, beispielsweise durch Adhäsion verursacht, sorgen dafür, dass das Zytosol der Zelle in manchen Bereichen näher an der Oberfläche lokalisiert ist und damit heller fluoresziert. Auf diese Weise wird die Gesamtstrukturierung der ventralen Zellmembran untersucht. Dieser Ansatz hat neben der Tatsache, dass es sich um lebende Zellen handelt, zusätzlich den Vorteil, dass man sich nicht im Vorhinein auf eine spezielle Adhäsionsform festlegen muss. Dieses wäre bei der Wahl eines Antikörpers gegen ein Protein der Adhäsionsstrukturen der Fall gewesen. Abbildung 11 zeigt die Aufnahmen, die bei der mit der Calceinfärbung durchgeführten Untersuchung entstanden.

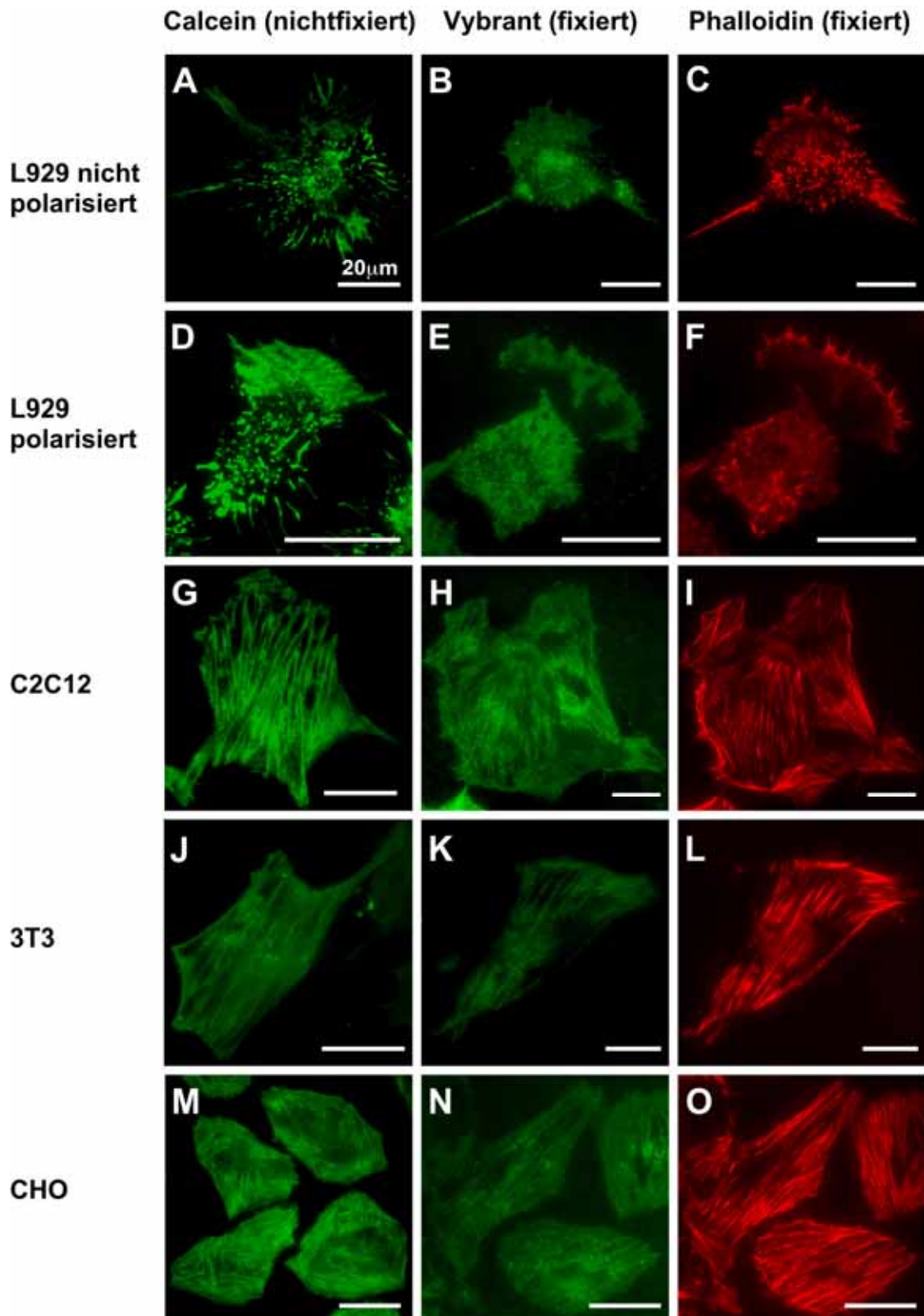


Abbildung 11: Vergleich des Adhäsionsmusters der untersuchten Zelllinien mittels TIRF-Mikroskopie und Korrelation des Musters mit dem filamentösen Aktin. Die Färbung erfolgte zytosolisch mit Calcein oder Vybrant CFDA SE. Aktin wurde mit Phalloidin-Alexa 546 gefärbt. L929-Fibroblasten wurden mit zweierlei Morphologien gefunden: nichtpolarisiert (A-C) und polarisiert (D-F). Das Adhäsionsmuster ist bei beiden Morphologieformen punktförmig. C2C12-, 3T3-

und CHO-Zellen zeigen ein riefenförmiges Adhäsionsmuster (G-O). Das Adhäsionsmuster bei der Färbung mit Vybrant CFDA SE (B, E, H, K, N) ist ähnlich dem der Färbung mit Calcein (A, D, G, J, M). Die Aktinfärbung zeigt, dass das filamentöse Aktin für die Ausprägung des Adhäsionsmusters verantwortlich ist. C2C12- (I), 3T3- (L) und CHO-Zellen (O) haben lange, parallel angeordnete Aktinfasern. Bei den L929- Zellen sind im Aktinbild Punkte zu erkennen (C, F).

Die ventrale Membran der Zellen ist nicht gleichmäßig parallel zum Substrat angeordnet, sondern weist eine zelltypspezifische Strukturierung auf, die mit der TIRF-Mikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Diese Strukturierung wird auf die Adhäsion der Zellen am Substrat zurückgeführt und wird daher im Folgenden als Adhäsionsmuster bezeichnet werden.

Die erste Spalte von Abbildung 11 zeigt die Adhäsionsmuster der Calcein gefärbten Zellen in der TIRF-Mikroskopie (Abbildung 11 A, D, G, J, M). Die L929-Fibroblasten treten in zwei verschiedenen Morphologieformen auf. Die nichtpolarisierte Zelle ist rund und adhäriert punktförmig am Substrat (A). Das Auftreten lediglich vereinzelter Adhäsionspunkte spricht dafür, dass der gesamte Zellkörper außerhalb des TIRF-Anregungsfeldes liegt. Bei der zweiten Morphologieform der L929-Zellen handelt es sich um polarisierte Zellen, wie sie in der Literatur im Zusammenhang mit der Migration beschrieben werden (Ridley et al. 2003). Das Adhäsionsmuster der polarisierten Zelle ist in zwei Teile zu unterteilen. Im Bereich der Zellfront ist ein flächiger Adhäsionsbereich zu erkennen. Im hinteren Teil der Zelle gleicht das Adhäsionsmuster dem der nichtpolarisierten Zelle und erscheint punktförmig (D). Der Bereich der Zellfront ist kaum strukturiert und gleichmäßig hell, was darauf hindeutet, dass sich die Zelle dort sehr nah am Glassubstrat befindet.

Die Zellen der anderen drei Zelllinien zeigen ein streifenförmiges Adhäsionsmuster (Abbildung 11, G-O). Dabei erscheint die Zellunterseite an sich dunkel und wird von langen parallelen hellen Streifen durchzogen. Da diese Streifen heller als der Rest der Zellmembran sind, müssen sie näher am Substrat lokalisiert sein, also nach unten vertiefte Riefen in der Zellmembran darstellen. Daher wird diese Form des Adhäsionsmusters im Folgenden als riefenförmig bezeichnet.

Bei C2C12-Zellen ist der Bereich zwischen den Riefen komplett dunkel, d. h. der über den Riefen liegende Zellkörper wird vom TIRF-Feld nicht angeregt. (Abbildung 11, G). Das bedeutet, dass die Riefen hier tiefer sind als z. B. bei 3T3-Zellen (J), bei denen die gesamte Zellunterseite zu erkennen ist und die Riefen lediglich heller fluoreszieren. In C2C12- und 3T3-Zellen erstrecken sich die Riefen über die gesamte Zellunterseite parallel zur Zelllängsachse. In CHO-Epithelzellen findet man die Adhäsionsriefen im Unterschied zu C2C12- und 3T3-Zellen entlang der Zellränder (M). Häufig ist das Zentrum bei diesen Zellen nicht strukturiert.

Zur genaueren Bestimmung der Ursachen für die Strukturierung der Zellunterseite wurde überprüft, ob die Adhäsionsmuster mit definierten Strukturen der Adhäsionskomplexe in Zusammenhang zu bringen sind, da die Strukturierung der ventralen Zellmembran auf die Adhäsion der Zellen am Substrat zurückgeführt wird. Auf Grund der langen parallelen Riefen bei einem Teil der Zellen wurde eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts überprüft.

Die Färbung des filamentösen Aktins (F-Aktin) erfolgte mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin-Alexa 546. Da diese Färbung nur im fixierten Zustand der Zellen möglich ist, musste das Adhäsionsmuster ebenfalls mit einem fixierbaren Farbstoff angefärbt werden. Das vorher verwendete Calcein eignet sich dafür nicht; stattdessen wurde Vybrant CFDA SE verwendet. Vybrant CFDA SE ist wie Calcein membrangängig, bildet aber mit zytosolischen Proteinen Schiff'sche Basen aus und kann somit fixiert werden. Das Adhäsionsmuster nach der Vybrant CFDA SE Färbung unterscheidet sich im Prinzip nicht vom beobachteten Muster in den Calcein gefärbten Zellen (Abbildung 11). Die zellspezifischen Adhäsionsmuster sind mit beiden Färbemethoden zu erkennen. Daraus kann man schließen, dass die Adhäsionsmuster durch die Fixierung nicht verändert wurden. Insgesamt wurde allerdings eine stärkere Hintergrundfluoreszenz detektiert. Extrazellulär am Glas adsorbierte Proteine aus dem Medium reagieren ebenfalls mit dem Farbstoff und bilden so die Hintergrundfluoreszenz aus (H, N). Intrazellulär wurde mit Vybrant CFDA SE eine selektivere Färbung als mit Calcein erwartet, da nur die Proteine des Zytosol gefärbt wurden. Dies ist nicht der Fall, sondern die Ausprägung der zellspezifischen Muster ist unschärfer als bei Calcein. Daraus lässt sich schließen, dass die Vybrant CFDA SE Färbung nicht strukturerhaltend ist. Zusätzlich ist zu bedenken, dass Aktin den Hauptbestandteil der zytosolischen Proteine darstellt und daher mit Vybrant CFDA SE wohl hauptsächlich Aktin gefärbt wurde. Somit eignet sich der Farbstoff nicht für die untersuchte Fragestellung.

Der direkte Vergleich des Adhäsionsmusters in der Calceinfärbung mit der Anordnung des Aktinzytoskeletts zeigt, dass letzteres für die Ausbildung der Adhäsionsmuster verantwortlich ist. In der nichtpolarisierten L929-Zelle findet man ein punktförmiges Aktinbild (Abbildung 11 C), das dem Adhäsionsmuster entspricht. Der polarisierte L929-Fibroblast besitzt eine Zellfront mit kurzen Aktinfasern und einen Zellkörper mit Aktinpunkten oder sehr kurzen Aktinfasern (F). An der Zellfront ist nur das Lamellipodium zu erkennen. Der restliche Bereich der Lamelle erscheint dunkel. Auch diese Anordnung lässt sich im Adhäsionsmuster wiederfinden. In C2C12- (I), 3T3- (L) und CHO-Zellen (O) sind lange parallele Fasern zu beobachten, die den Riefen im Adhäsionsmuster entsprechen.

Die folgende Tabelle enthält eine Zusammenfassung der bisher gewonnenen Ergebnisse.



Zell-Linie	Anordnung der Zellen	Migration	Migrationsform	Adhäsionsmuster
CHO	nur in Zellgruppen	nahezu keine Migration	Bewegung erfolgt nur nach der Zellteilung zur erneuten Adhäsion	riefenförmig entlang der Zellränder
L929	Individuell, kein Kontakt mit Nachbarzellen	Migration: ca. 23 $\mu\text{m}$ / h	Zellen vermeiden Kontakt zu Nachbarzellen voneinander unabhängige Migration der Einzelzellen	punktförmig
C2C12	kleine Zellgruppen	Migration: ca. 17,5 $\mu\text{m}$ / h	Zellen nehmen Kontakt mit Nachbarzellen auf Migration der Zellen aufeinander zu oder in kleinen Gruppen	riefenförmig parallel zur Zelllängsachse
3T3	kleine Zellgruppen	Migration: ca. 6,5 $\mu\text{m}$ / h	Zellen nehmen Kontakt mit Nachbarzellen auf Migration der Zellen aufeinander zu oder in kleinen Gruppen	riefenförmig parallel zur Zelllängsachse

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der bisher untersuchten Zelleigenschaften

Die Aktinfasern erscheinen in den Zellen mit riefenförmigem Adhäsionsmuster in der Intensität homogen, sie müssen also parallel zum Substrat angeordnet sein (Abbildung 11 F). Da nur das F-Aktin der Zellen angefärbt wurde, muss auch das punktförmige Aktinbild in L929-Zellen durch filamentöses Aktin verursacht werden.

Dieser vermeintliche Widerspruch wurde daher näher untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass das punktförmige Muster auf die zur Aufnahme verwendete Mikroskopietechnik zurückgeführt werden könnte, wurden die Aktinsignale bei Anregung durch ein evaneszentes Feld mit denen bei Anregung mit Epifluoreszenz verglichen. Diesem Experiment liegt die Frage zu Grunde, ob die Aktinfilamente in den L929-Zellen in höheren Ebenen der Zelle liegen und die punktförmigen Signale das Ende von bogenförmig angeordneten Fasern darstellen. Zum Vergleich wurde die Lage des F-Aktins in einer Zelle mit riefenförmigem Adhäsionsmuster (hier C2C12) ebenfalls untersucht. Abbildung 12 zeigt die Aktinstrukturen im Vergleich.

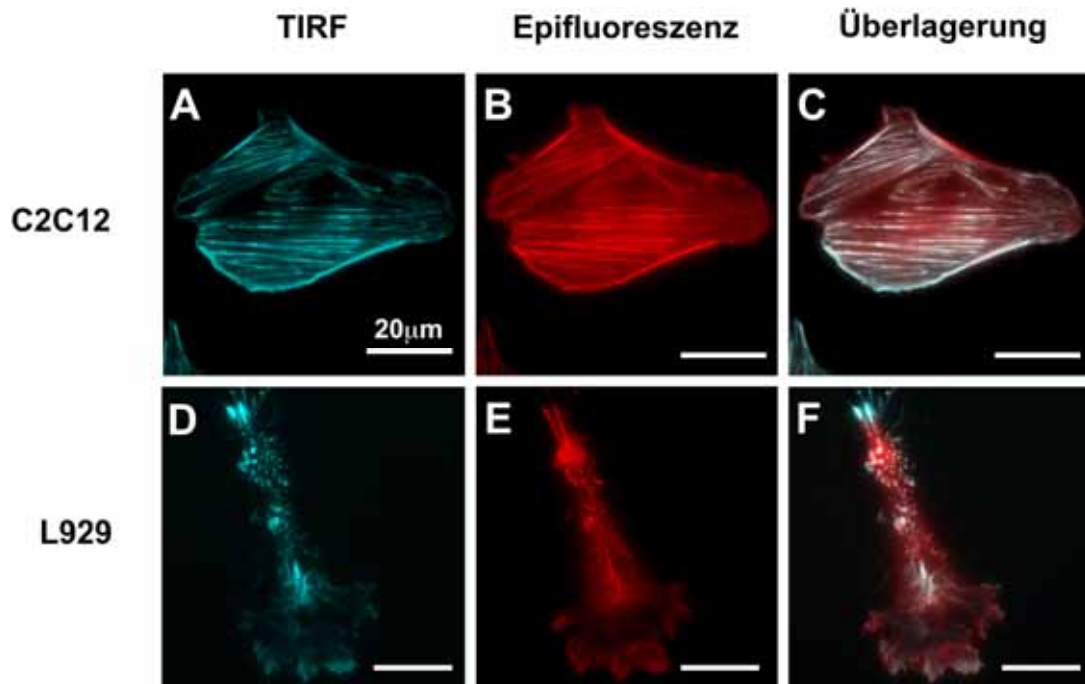


Abbildung 12: Vergleich der sichtbaren Aktinstrukturen nach Anregung durch TIRF- oder Epifluoreszenzbeleuchtung (Falschfarbendarstellung im RGB-Raum). A, B: Bei C2C12-Muskelzellen ist zwischen TIRF- (A) und Epifluoreszenzanregung (B) kein Unterschied erkennbar. C: Überlagerung von A und B: Die Fasern erscheinen weiß. D-F: polarisierter L929-Fibroblast. Im Epifluoreszenzbild (E) sind zusätzlich zum TIRF-Bild (D) Aktinfasern zu erkennen, die sich von der Zellmitte zum Ende des Zellausläufers hin erstrecken. Die Überlagerung (F) zeigt, dass die Fasern (F, rot) die im evaneszenten Feld sichtbaren Aktinbereiche (F, weiß) verbinden.

Im Gegensatz zu den vorherigen Abbildungen, bei denen die Grauwertbilder in den Farben der Fluoreszenz nachkoloriert wurden, handelt es sich bei Abbildung 12 um eine Falschfarbendarstellung im RGB-Farbraum. Die Zuordnung der Einzelfarben zu den detektierten Signalen bei TIRF- oder Epifluoreszenzanregung erfolgte derart, dass sich für Signale, die mit beiden Anregungsarten detektiert wurden, in der Überlagerung der beiden Bilder die Farbe weiß ergibt. Somit wurden die bei TIRF-Anregung detektierten Signale mit den beiden Farben grün und blau belegt, so dass die Bilder türkis erscheinen. Den Signalen der Epifluoreszenzbeleuchtung wurde die Farbe rot zugeordnet. Die Signale unter Epifluoreszenzbeleuchtung wurden auf derselben Fokusebene aufgenommen, wie die Signale aus dem evaneszenten Anregungsfeld. Dadurch wurde die Eindringtiefe der Anregungsfluoreszenz erhöht, aber trotzdem der Fokusbereich auf das ventrale Aktin gelegt.

Das Bild der C2C12-Muskelzelle bei TIRF-Anregung ist von gleichmäßig hellen, parallelen Aktinfasern dominiert (Abbildung 12 A). Dieses Aktinbild entspricht den vorherigen Ergebnissen. Bei Anregung durch Epifluoreszenzbeleuchtung ändert sich grundsätzlich an den Signalen nichts. Allerdings bildet nicht fokussiertes Streulicht aus höheren Schichten der Zelle einen rötlichen Hintergrund (B). Dieser Bereich ist bei Anregung durch das evaneszente Feld schwarz, da das Aktin des Zellkörpers außerhalb des

TIRF-Anregungsfeldes liegt. Bei der C2C12-Zelle sind die Signale aus den beiden Anregungsformen nahezu identisch (Abbildung 12 C). An den Stellen, wo die Aktinfasern in der Überlagerung nicht komplett weiß erscheinen, kann man erkennen, dass sie bei TIRF-Anregung zwar vorhanden sind, aber in geringerer Stärke fluoreszieren. Die Aktinfasern in C2C12-Muskelzellen liegen gleichmäßig parallel zur basalen Zellmembran.

Im Gegensatz dazu kann man bei den L929-Zellen zwischen den Signalen der beiden Anregungsformen einen deutlichen Unterschied erkennen. Abbildung 12 D zeigt das Aktinbild eines polarisierten Fibroblasten bei TIRF-Anregung. Die Zelle lässt sich in zwei Bereiche unterteilen. Die Lamelle und der Zellkörper bilden den vorderen und größeren Teil. Der Zellausläufer ist zwar länger, umfasst aber das kleinere Zellvolumen. Die Aktinverteilung über die gesamte Zelle ist nicht homogen. Am Übergang der Zelle zum Zellausläufer ist eine sternförmige Aktinansammlung zu erkennen. Der Zellausläufer zeigt das bekannte Punktmuster. Am Ende der Zelle befindet sich noch mal ein Bereich mit einem verstärkten Aktinsignal (D). Die Lamelle besitzt nur eine geringe Signalintensität und ist wenig strukturiert. Im Lamellipodium sind Ansätze von Aktinfasern zu erkennen. Regt man diese Zelle mit Epifluoreszenz an, so erkennt man zusätzlich zu den beschriebenen Strukturen lange Aktinfasern (E). Diese Filamente verbinden die zentrale, sternförmige Aktinansammlung mit dem Zellende. Das Lamellipodium ist verbreitert und die Fasern sind im Vergleich zum Signal bei TIRF-Anregung verlängert (D). In der Überlagerung bleiben die Fasern rot, d. h. diese Signale kommen nicht vor, wenn die Anregung mit dem evaneszenten Feld erfolgt (F). Die Punkte, die Zellfront und die zentrale sternförmige Aktinstruktur erscheinen weiß, da sie bei beiden Anregungsarten detektierbar sind. Die mittleren Teile des Aktinskeletts in L929-Fibroblasten sind mit dem TIRF-Feld nicht anregbar. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktinfasern in Bögen in der Zelle liegen.

### **5.3 *Dynamik der Adhäsionsmuster***

Nachdem die zellspezifischen Grundmuster der Adhäsion bei den verschiedenen Zelllinien charakterisiert sind und auf die Anordnung des ventralen Aktins zurückgeführt werden konnten, wurde anschließend die Dynamik der Adhäsionsstrukturen betrachtet, in der Annahme, daraus die ersten wesentlichen Gesetzmäßigkeiten für die Entstehung von Zellspuren ableiten zu können.

Dazu wurde der mikroskopische Aufbau derart modifiziert, dass eine Zeitrafferstudie von gefärbten Zellen im TIRF-Modus durchgeführt werden konnte. Die dazu ergriffenen Maßnahmen sind im Methodenteil aufgeführt und waren das Ergebnis eines langwierigen Optimierungsprozesses. Erst nach Abschluss dieser Arbeiten war es möglich, Fokusstabilität im TIRF-Modus über mehrere Tage zu gewährleisten. Ebenfalls konnte auf Grund der Verwendung eines automatischen Verschlusssystems die Strahlungsintensität, der die Zellen ausgesetzt waren, deutlich reduziert werden. Dadurch wurden erstmals experimentelle Bedingungen geschaffen, unter denen sich Zellen über Tage normal teilen und weiterhin migrieren konnten.

#### **5.3.1 Darstellung von Bildserien aus Zeitrafferstudien mittels einer Farbkodierung**

Zur Auswertung von Zeitrafferstudien und zur Darstellung von dynamischen Prozessen in statischen Einzelbildern, wurde eine Methode entwickelt, die die Änderung der Signale über die Zeit von drei aufeinander folgenden Bildern in einem Bild darstellt. Dazu wurde eine Farbkodierung im RGB-Farbraum genutzt. Wie im Methodenteil (s. Abschnitt 4.2.4.3) beschrieben, wurden jeweils drei aufeinander folgende Grauwertbilder den Farben blau, grün und rot zugeordnet und übereinander gelegt. Abbildung 13 zeigt die Kodierung und die damit erzielten Effekte schematisch.

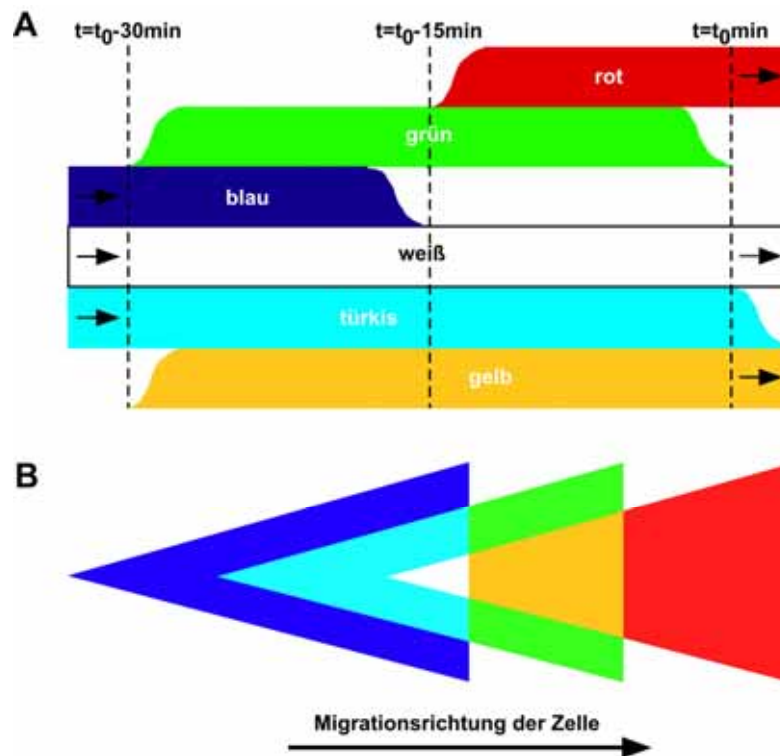


Abbildung 13: Schema zur Erklärung der eingesetzten Farbkodierung: A: Drei aufeinander folgende Grauwertbilder ( $t = -30 \text{ min}$ ,  $t = -15 \text{ min}$  und  $t = 0 \text{ min}$ ) werden zu einem RGB-Bild übereinander gelegt. Dieser Vorgang wird mit allen Bildern einer Zeitserie wiederholt:  $b/g/r = 1/2/3, 2/3/4, \dots n-2/n-1/n$ . B: schematische Zelle während der Migration in der Farbkodierung.

Die nach der Überlagerung der Grauwertbilder erhaltenen Farben geben Auskunft darüber, wie lange und zu welchem Zeitpunkt das Signal in der Zeitserie zu beobachten war. Die farbkodierten Bilder beschreiben daher nicht mehr einen Zeitpunkt, sondern einen Zeitraum von 30 Minuten. Daraus ergeben sich die folgenden Farinterpretationen: Signale, die im letzten Bild einer Dreierserie entstanden sind, erscheinen rot; Signale, die nur im mittleren Bild vorhanden sind, erscheinen grün; Signale, die nur im ersten Bild vorhanden waren, erscheinen blau. Fluoreszenzsignale, die auf mehreren Bildern zu sehen sind, ergeben Mischfarben. Dabei ergibt sich für Signale, die sowohl im ersten als auch im zweiten Bild detektiert werden, als Farbe gelb. Signale, die im zweiten und dritten Bild erscheinen, sind türkis dargestellt und Signale, die konstant auf allen drei Bildern vorhanden sind, werden weiß kodiert. Abbildung 13 A zeigt die Bedeutung der Farben an Hand der drei Zeitpunkte.

In Abbildung 13 B ist als Beispiel für diese Auswertemethode schematisch eine migrierende Zelle in der klassischen Migrationsform dargestellt. Bei einer linear von links nach rechts wandernden Zelle würden sich die Signale wie im Schema dargestellt zu den einzelnen Farben ergeben. Dann lassen sich auf Grund der Farbkodierung Aussagen über die Wanderungsrichtung der Zelle machen. Ebenso lassen sich interessante Aussagen über die Langlebigkeit von Signalen und damit über die dahinter stehenden

Strukturen, wie z. B. über das Aktinzytoskelett oder die Stabilität von Adhäsionsmustern, treffen. Diese Tatsache wird im weiteren Verlauf der Arbeit von großer Bedeutung sein.

Die farbkodierten Einzelbilder repräsentieren nach der Überlagerung eine Zeitspanne. Die drei zu Grunde gelegten Datenpunkte liegen zu Beginn, in der Mitte und am Ende des überspannten Zeitraums. Das erste Bild einer Abbildung, mit  $t = 0$  bezeichnet, entspricht den Grauwertbildern zum Zeitpunkt  $t = -30$ ,  $t = -15$  und  $t = 0$ . Die angegebenen Zeiten in den folgenden Bildern beziehen sich dann immer auf die Verschiebung des gesamten Beobachtungszeitraumes.

Die folgenden Abbildungen von Zeitserien werden immer unter Anwendung des soeben beschriebenen Systems der Farbkodierung dargestellt und interpretiert.

### 5.3.2 Dynamik des Adhäsionsmusters von CHO-Zellen

Zunächst wurde das experimentelle System zur Untersuchung der Dynamik des Adhäsionsmusters an den nichtmigrierenden Epithelzellen (CHO) etabliert. Das erforderte eine Modifizierung des Protokolls zur Calceinfärbung dahingehend, dass der Farbstoff im Medium verbleiben konnte und die Zellen permanent mit Farbstoff beladen wurden.

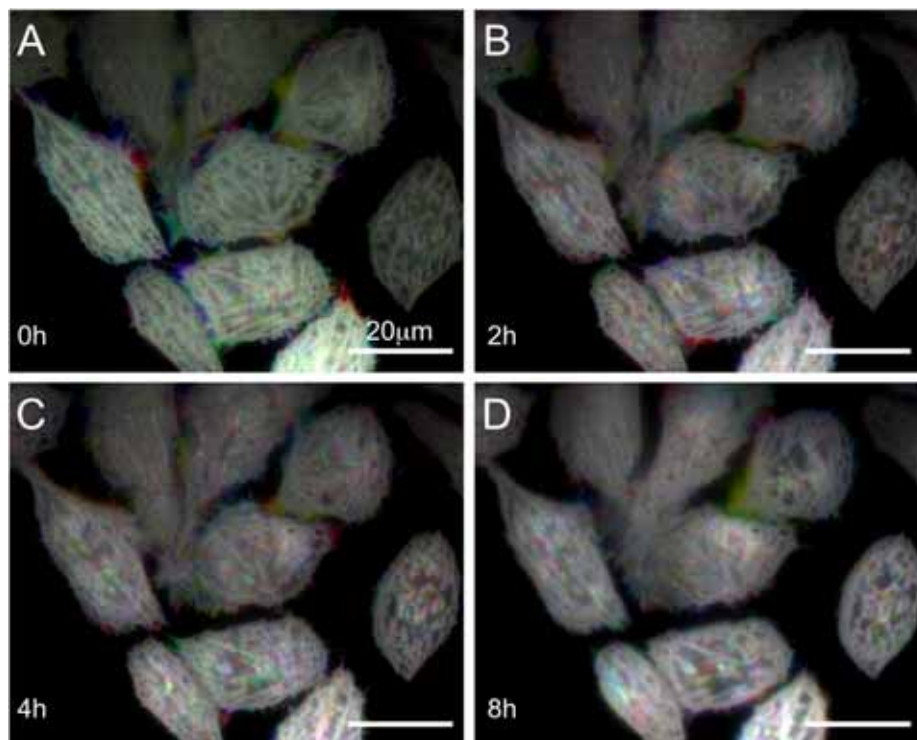


Abbildung 14: Zeitrafferstudie der Adhäsionsmuster von CHO-Zellen nach Calceinfärbung mittels TIRF-Mikroskopie. Der Abstand zwischen den Grauwertbildern betrug 15 Minuten. Die Einzelbilder ergeben sich aus der RGB-Farbkodierung (s. Abbildung 13). Stabile Bereiche erscheinen weiß, Änderungen in Farbe. Das Adhäsionsmuster von CHO-Epithelzellen ist über einen Zeitraum von mehreren Stunden stabil (weiß, A-D).

Abbildung 14 stellt die Ergebnisse einer TIRF-Zeitrafferstudie des Adhäsionsmusters von CHO-Zellen über 8 Stunden dar. Die Aufnahmen zeigen auch über den längeren Zeitbereich und nach der Überlagerung für die Farbkodierung ein hohes Maß an Schärfe und Helligkeit. Daraus lässt sich schließen, dass die Adaption der Färbung an den längeren Zeitraum erfolgreich war und die Fokusstabilität gewährleistet ist.

Wie mittels der RC-Durchlichtaufnahmen gezeigt wurde bewegen sich die CHO-Zellen kaum (s. Abbildung 10, A). Daher sind erwartungsgemäß auch keine großen Änderungen in der Zeitrafferaufnahme zu beobachten. Folglich erscheint das Adhäsionsmuster in der Farbkodierung weiß. An den Ecken der Zellen tauchen immer wieder farbige Bereiche auf. Dort spiegeln sich das Tasten der Zelle und die kleinen Bewegungen wieder, denen keine Vorzugsrichtung zugeordnet werden konnte. Die Dynamik des Adhäsionsmusters entspricht damit genau dem im RC-Durchlichtverfahren beobachteten Verhalten der Zellen in In-vitro-Kultur (s. Abbildung 10).

### **5.3.3 Dynamik des Adhäsionsmusters von L929-Fibroblasten**

Bei der Übertragung des experimentellen Aufbaus auf die migrierenden Zellen stellte sich folgendes Problem dar. Die wiederholte Bestrahlung von L929-Fibroblasten mit blauem Licht erwies sich in Kombination mit dem angereicherten Calcein in der Zelle als zytotoxisch. Eine weitere Reduzierung der Strahlung war nicht möglich, da die gewählten Zeitabstände bereits das maximal sinnvolle Zeitintervall ausschöpfen (ein Bild in 15 Minuten). Daher wurde eine grün anregbare Variante des Calceinfarbstoffs (Calcein Red Orange) getestet. Dieser Farbstoff kam ebenfalls nicht in Frage, da er sich bereits ohne Anregung als zytotoxisch herausstellte.

Eine zellverträgliche Variante stellte die Transfektion mit einem reinen DsRed-DNA-Vektor dar. Transfizierte Zellen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten oder Änderungen des Wachstumsverhaltens. Zellteilungen konnten mehrfach unter TIRF-Bedingungen beobachtet werden. DsRed liegt wie Calcein im Zytosol vor und wird auf Grund des viralen Promoters permanent exprimiert, so dass immer genügend Fluorophor zur Verfügung steht. Zusätzlich wird die Strahlungsbelastung reduziert, da es sich um ein grün anregbares Fluorophor handelt. Die im TIRF-Feld beobachteten Adhäsionsmuster entsprechen denen einer Calceinfärbung. Aus Abbildung 15 lässt sich die Dynamik der Adhäsionsmuster einer DsRed-transfizierten L929-Zelle ablesen.

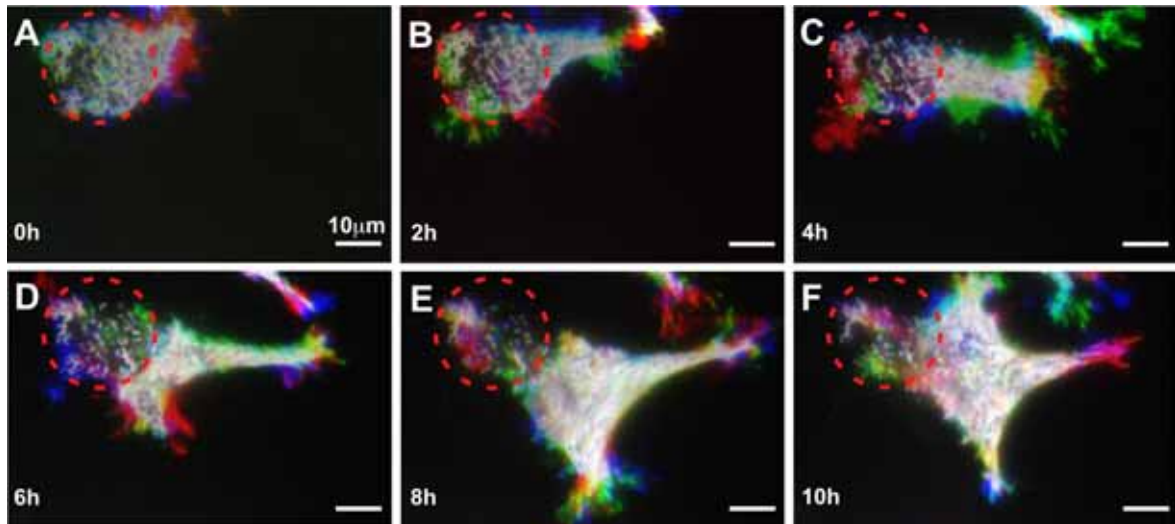


Abbildung 15: Zeitrafferstudie des Adhäsionsmusters eines mit DsRed-transfizierten L929-Fibroblasten mittels TIRF-Mikroskopie. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Bildfolge zeigt die Dynamik der Zelle und ihres Adhäsionsmusters im Verlauf von 10 Stunden. Die Morphologie des Fibroblasten ändert sich von nichtpolarisiert (A, B), auf polarisiert (C) und die Zelle beginnt zu migrieren (D-F). Der gestrichelte Kreis markiert die Ursprungsposition der Zelle.

Während des Beobachtungszeitraums veränderte sich die Morphologie des L929-Fibroblasten und die Zelle begann zu migrieren. Dabei konnte gleichzeitig eine Veränderung des Adhäsionsmusters beobachtet werden. Die nichtpolarisierte Zelle ist rund und haftet punktförmig am Substrat (Abbildung 15 A). Der gestrichelte Kreis markiert die Ursprungsposition der sitzenden Zelle. Bereits hier kann man auf der rechten Seite der Zelle den Ansatz einer Front erkennen, der auf Grund der Farbkodierung rot erscheint. 2 Stunden später hatte sich die Zelle in die angezeigte Richtung gestreckt (B). Die Adhäsion im runden Zellkörper wurde dabei nicht verändert. Nach vier Stunden hatte sich die Zelle in ihrer Länge fast verdoppelt. Die Front ist stark adhären und es sind keine auffallenden Strukturelemente zu sehen (Abbildung 15 C). Im Gegensatz dazu hatte sich die Adhäsion im hinteren Bereich der Zelle etwas verringert. Die jetzt noch vorhandenen Adhäsionspunkte sind Teil der Adhäsion der Ursprungszelle (A, C). Dieser Prozess setzte sich in den folgenden 4 Stunden weiter fort. Die Zelle entwickelte eine vollständige Migrationsfront und nahm die typische Dreiecksform an (D, E). Die Adhäsion im Zellausläufer wurde dabei weiter reduziert. Dabei blieben Adhäsionspunkte erhalten, die bereits in der sitzenden Zelle zu sehen waren (A, D). Die Zellfront ist breiter als normal und leicht nach innen gekrümmt (E). Diese Tatsache erklärt sich daraus, dass die Zelle nicht in eine eindeutige Vorzugsrichtung wanderte. In Abbildung 15 F hat sich eine zweite Front gebildet. Die Zelle änderte ihre Migrationsrichtung und wanderte nach oben.

Im Adhäsionsmuster nichtmigrierender L929-Zellen gibt es dynamische und stabile Adhäsionen (Geggier und Fuhr 1999). Hier wurde ergänzend gezeigt, dass Adhäsionspunkte auch dann erhalten bleiben, wenn die Zelle ihre Morphologie ändert (Abbildung 15 A, E). Um diese Beobachtung zu verifizieren wurde die Farbkodierung



modifiziert. Das in einem Bild dargestellte Zeitintervall wurde von 30 Minuten auf 6 bzw. 8 Stunden vergrößert. Die nach dieser Modifizierung weiß erscheinenden Adhäsionspunkte, sind sowohl in der nichtpolarisierten Zelle, als auch in der migrierenden Zellform zu finden.

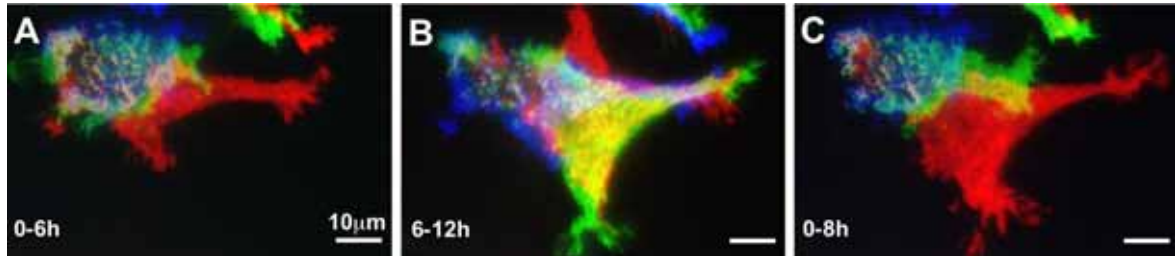


Abbildung 16: Darstellung der stabilen Adhäsionspunkte des in Abbildung 15 gezeigten L929-Fibroblasten mittels einer modifizierten Farbkodierung. Die Überlagerung wurde aus Bildern zu den Zeitpunkten  $t = -6$  h,  $t = -3$  h und  $t = 0$  h (A, B) und  $t = -8$  h,  $t = -4$  h und  $t = 0$  h (C) gemacht. Die weiß erscheinenden Adhäsionspunkte bleiben über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten.

In den ersten 6 Stunden der Beobachtung ist die Änderung der Morphologie zu erkennen. Dabei bleibt ein großer Teil der Adhäsionen aus der nichtpolarisierten Zelle erhalten. Man erkennt an Hand der weißen Färbung den Umriss und einen großen Teil des Adhäsionsmusters der nichtpolarisierten Zelle wieder (Abbildung 16 A). Die Zellfront erscheint komplett rot, da sie erst im letzten Bildpunkt dazugekommen ist. Die Änderung ist zwischen den Stunden 6 und 12 deutlich kleiner, da die Zelle während dieser Zeitspanne nur die Front verändert. Daher ist die Front nach rechts-unten gelb und die neue Front nach oben rot eingefärbt (B). Die Anzahl der stabilen Adhäsionspunkte (B, weiß) ist geringer geworden, da die Adhäsion in den Zellausläufern während der Migration reduziert wird. Betrachtet man die Zeitspanne von 8 Stunden erscheint die komplette Zellfront rot, da dieser Teil erst in den zweiten 4 Stunden entstanden ist (C). Adhäsionspunkte aus der Ursprungsmorphologie sind im Bereich des Zellausläufers zu finden (Abbildung 16 C, weiße Punkte). Ihre Anzahl ist deutlich reduziert.

### 5.3.4 Dynamik der Adhäsionsmuster von C2C12- und 3T3-Zellen

Zum Vergleich mit dem Ergebnis bei den L929-Fibroblasten wurde die Dynamik des Adhäsionsmusters der beiden anderen migrierenden Zelllinien untersucht, um festzustellen, ob auch dort stabile Adhäsionsmuster zu beobachten sind. Auf Grund der Übereinstimmung der Ergebnisse werden die C2C12- und 3T3-Zellen im Folgenden zusammengefasst behandelt.

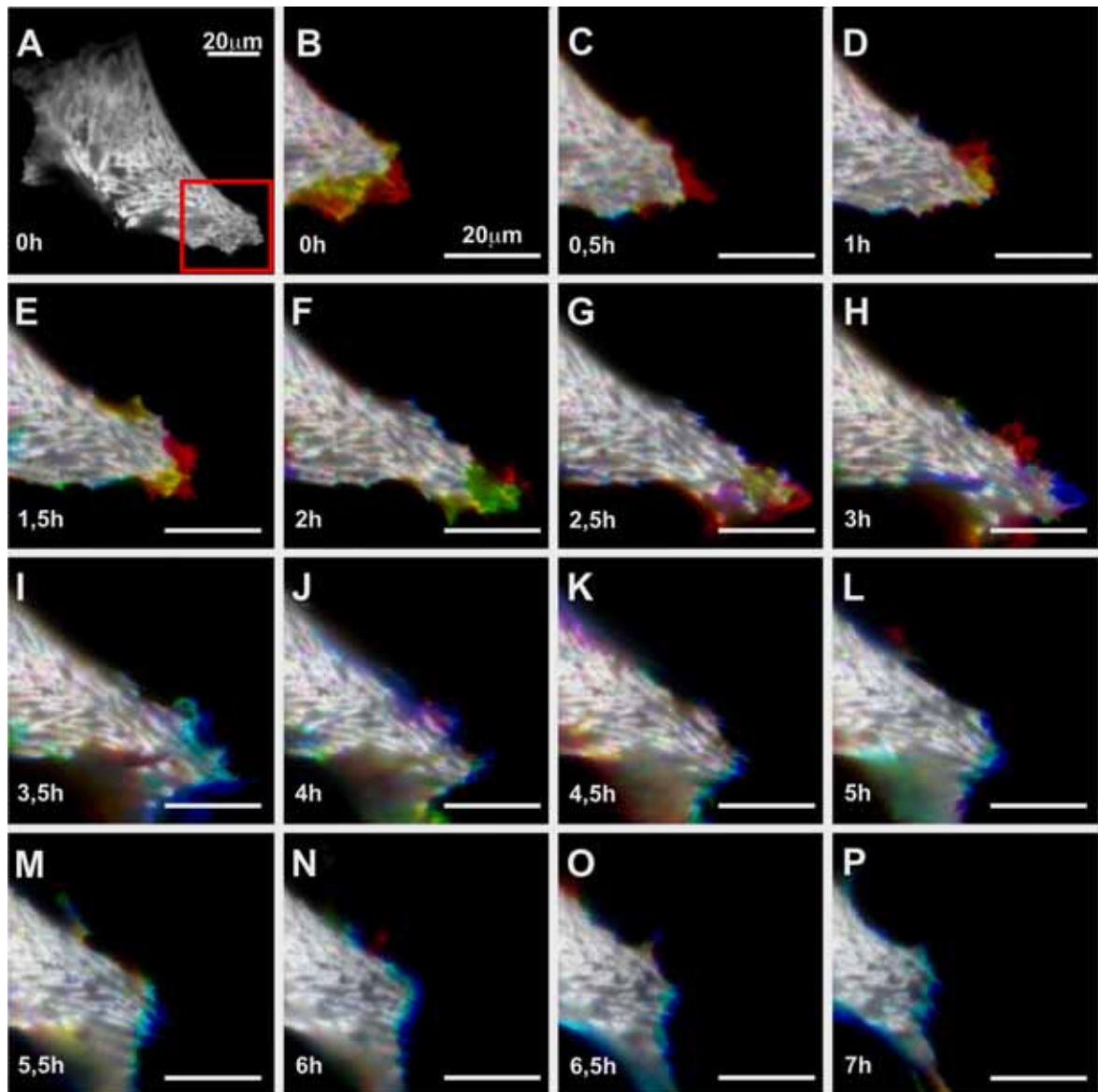


Abbildung 17: Zeitrafferstudie des Adhäsionsmusters einer DsRed-transfizierten C2C12-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A: Typisches Adhäsionsmuster einer C2C12-Muskelzelle. Der dynamische Bereich der Zelle wird vergrößert dargestellt (A, rotes Quadrat). Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Zelle bewegt sich in den ersten 3 Stunden vorwärts, (B-G) dreht dann um (H) und zieht den vorgeschobenen Teil wieder zurück (I-P). Auf Grund der Farbkodierung erscheint eine Protrusion rot und gelb und eine Retraction der Zelle türkis und blau. Das Adhäsionsmuster bleibt bei diesen Prozessen stabil (weiße Färbung).

In Abbildung 17 A ist eine C2C12-Muskelzelle nach DsRed-Transfektion während der Beobachtung im evaneszenten Feld über einen Zeitraum von 7 Stunden gezeigt. Aus der Ausrichtung der Riefen, die normalerweise entlang der Zelllängsachse verlaufen, kann man schließen, dass die Zelle ihre Bewegungsrichtung geändert hat. Die ursprüngliche Bewegungsrichtung verlief von oben nach unten und nun wird die Wanderungsrichtung nach rechts verändert. Die Zelle selbst ist entsprechend geformt. Das Adhäsionsmuster ist aus Riefen zusammengesetzt, die die Zelle aber nicht komplett durchspannen. Der

obere Teil der Zelle zeigt nur noch ein undeutliches Adhäsionsbild, während der untere Teil eine bevorzugte Ausrichtung nach rechts aufweist. Der dynamische Teil ist vergrößert dargestellt (A, rotes Quadrat).

Während der ersten 3 Stunden bewegte sich die Zelle diagonal nach unten (Abbildung 17 B-H). Während der Protrusion ist die Zellfront auf Grund der Farbkodierung rot eingefärbt (B-E). Die Protrusionsfront ist zuerst unstrukturiert (B, C), dann bilden sich die Adhäsionsriefen aus (E-G), wobei bestehende Riefen in den Protrusionsbereich hinein verlängert werden (D, E). Zusätzlich konnten kurze Riefen beobachtet werden, die unverändert an einer Stelle bestehen blieben, während sich die Zelle darüber hinweg bewegte (E-G). Nach 3 Stunden Beobachtung hatte die Zelle ihre maximale Ausdehnung erreicht (H).

In den folgenden 4 Stunden zog sie sich wieder zurück (Abbildung 17 I-P). Retraktionsvorgänge erscheinen in der Farbkodierung in den Farben türkis und blau. Entlang der Zellgrenze erstreckt sich daher ein Saum in türkis-blauen Farben. Während des Zurückziehens ist die Membran von Riefe zu Riefe leicht nach innen gekrümmt (L-N). Die Riefen an sich sind deutlich stabiler, da sie im Farbsaum noch in weiß zu erkennen sind (N). Dabei macht es den Eindruck, als würden die Riefen über die Zellgrenze hinaus ein Stückchen überstehen (M). Insgesamt sind weder bei der Protrusion noch bei der Retraktion die Adhäsionsmuster verändert worden, da sie die ganze Zeit über weiß erhalten bleiben. Änderungen sind nur an den Enden der einzelnen Riefen zu beobachten.

Im Vergleich zu den L929-Fibroblasten zeigen die C2C12-Muskelzellen deutlich weniger Variationen in ihrem Adhäsionsmuster. Ein ähnliches Verhalten wird auf Grund der Gleichheit der Adhäsionsmuster auch für die 3T3-Fibroblasten erwartet. In Abbildung 18 ist die Dynamik des Adhäsionsmusters einer 3T3-Zelle nach DsRed-Transfektion zu erkennen.

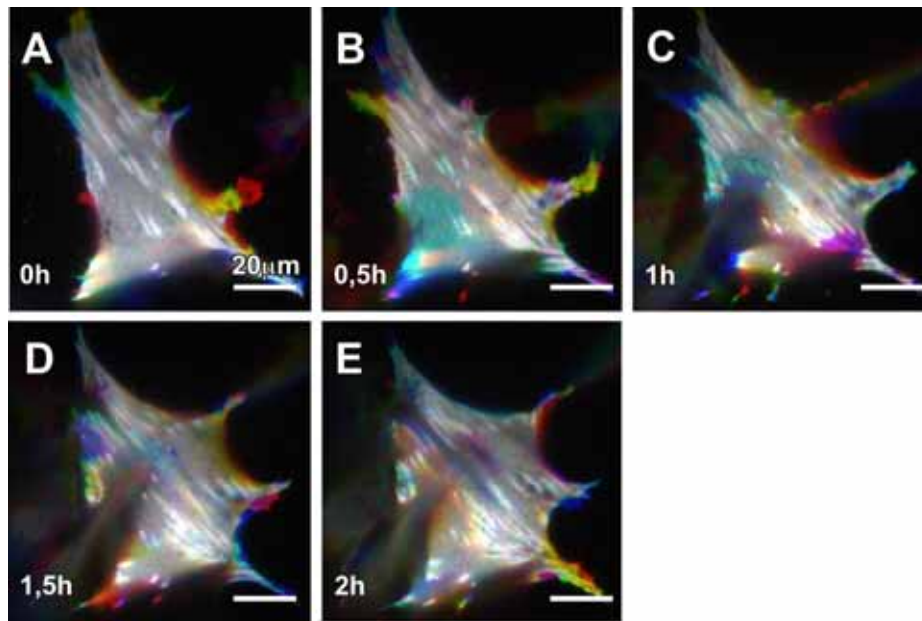


Abbildung 18: Zeitrafferstudie eines typischen Adhäsionsmusters einer DsRed-transfizierten 3T3-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Zelle verkürzt sich entlang der Riefenrichtung (A-C) und wird deutlich breiter (A-E).

Das TIRF Bild zeigt stabile Riefen entlang der Zelllängsachse (Abbildung 18 A). Zwei verschiedene Bewegungen wurden während der Beobachtung überlagert. Die Zelle verkürzte sich entlang der Riefenrichtung (A-C) und wurde gleichzeitig breiter (C-E). Das Zurückziehen der Zelle ist wie bei den C2C12-Zellen von einem farbigen Saum begleitet. In diesem Fall erfolgte der Vorgang jedoch schneller, so dass der türkis-farbene Bereich sehr schmal ausfällt und der blaue Bereich sehr breit (C). Gleichzeitig erkennt man wieder die leicht nach innen gewölbte Membran. Die Riefenenden sind hier noch in weiß zu erkennen, während der Saum bereits türkis oder blau gefärbt ist (C-E).

Auf Grund der Farbkodierung entsprechen sich eine Verbreiterung der Zelle und eine Protrusion farblich. Wird die Zellseite komplett nach rechts verschoben, so erscheint dieser Teil rot (Abbildung 18 A, C). In dem neu entstandenen Bereich bilden sich wieder Adhäsionsriefen aus (E). Eine längere Beobachtung dieser Zelle war nicht möglich, da von unten links eine nichttransfizierte Zelle ins Bild gewandert ist und sich unter die beobachtete 3T3-Zelle geschoben hat. Die zweite Zelle verwischte daher die Signale und behinderte das Sichtfeld (B-E).

Die Untersuchung der Dynamik der Adhäsionsmuster hat ergeben, dass die Riefen eine besonders stabile Struktur darstellen. In den ortsfesten CHO-Zellen weisen sie gar keine Schwankungen auf, in den mobilen Zellen (C2C12, 3T3) bleiben sie konstant erhalten. Modifikationen treten lediglich an den Enden der einzelnen Riefen auf. Ebenfalls beobachtet wurde, dass die Zelle sich über die Riefe hinwegbewegt (C2C12) oder dass eine Zellseitenwand komplett verschoben wurde (3T3). Das Punktmuster in den

L929-Fibroblasten unterliegt einer größeren Dynamik. Dort bleiben nur einzelne Adhäsionspunkte im Bereich des Zellausläufers erhalten.

## 5.4 Entstehung von Zellspuren

### 5.4.1 Beobachtung des Entstehungsprinzips und Morphologie von Zellspuren

Bei der Entstehung von Zellspuren spielt die Adhäsion des Zellendes eine besondere Rolle, so dass die Untersuchung auf diesen Bereich konzentriert wird. Da die L929-Zellen häufig Zellspuren hinterlassen (Fuhr et al. 1998), wird auf diesen Zelltyp fokussiert. Abbildung 19 stellt die dabei beobachteten Besonderheiten dar.

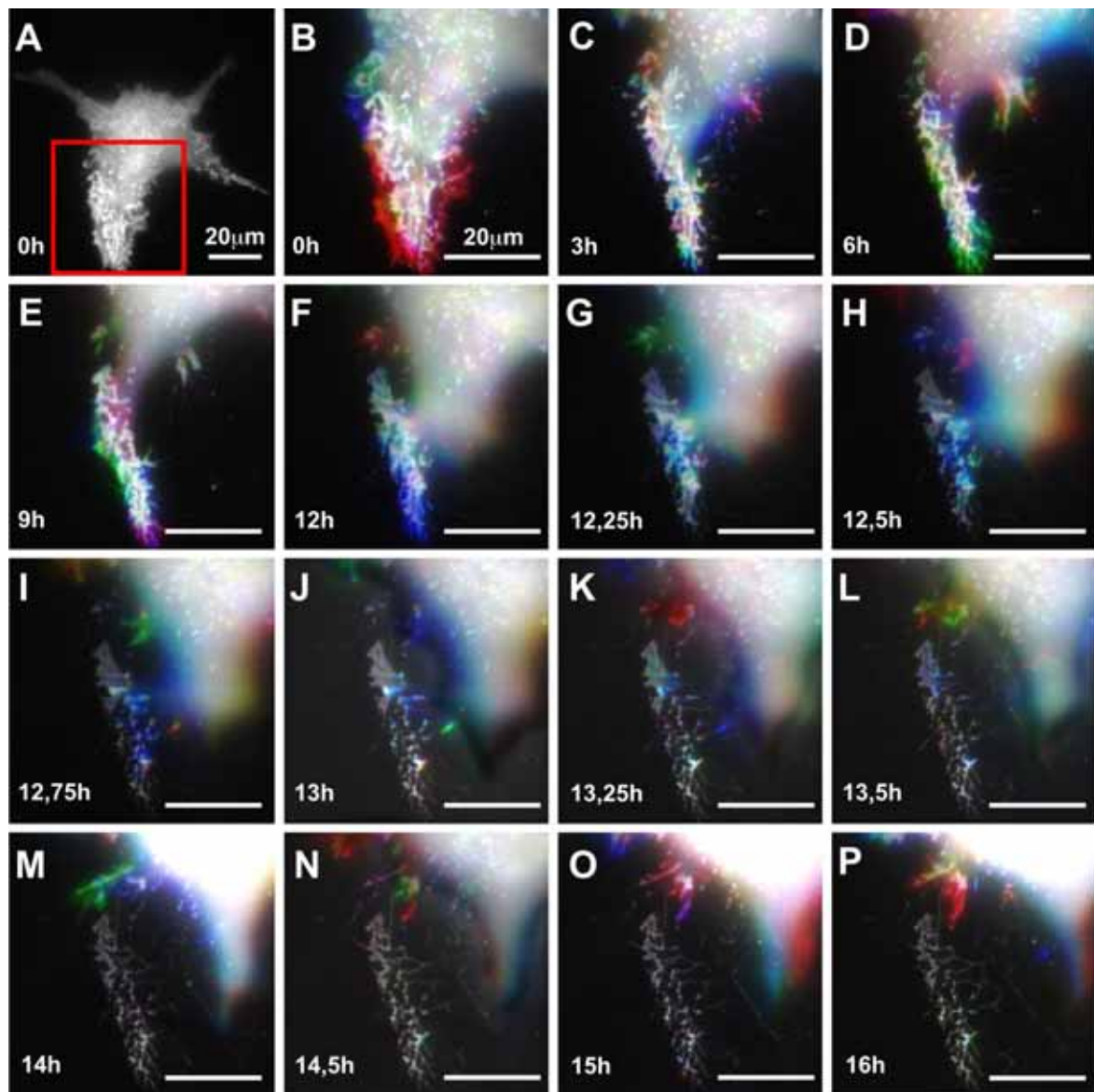


Abbildung 19: Zeitrafferstudie des Adhäsionsmusters im Zellausläufer einer DsRed-transfizierten L929-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A: L929-Fibroblast in der

typischen Migrationsmorphologie. Der Zellausläufer (A, rotes Quadrat) ist vergrößert dargestellt. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Zelle bewegt sich zunächst auf der Stelle (B, C), beginnt zu wandern (D, E) und verlässt den Bildausschnitt. Dabei bleibt ein Teil der Adhäsionspunkte zurück (J-P).

Die beobachtete Zelle zeigte zwar eine typische Migrationsmorphologie, begann aber nicht gleich zu migrieren, sondern fluktuierte erst eine Zeit lang auf einer Stelle. Dabei schwankte der Zellausläufer in seiner Breite (Abbildung 19 B, rote Ränder). In den folgenden 9 Stunden wurde der Zellausläufer kontinuierlich schmaler und der Zellkörper verlagerte sich weiter in Richtung des Zellschwerpunktes und damit in diesem Falle aus dem Bildausschnitt hinaus (C-E). In der gesamten Bildfolge sind Streulichtanteile aus den höheren Bereichen des Zellkörpers zu erkennen, die als weißer Schleier im rechten Teil der Bildausschnitte zu erkennen sind. Auf Grund der Überlagerung der Signale erscheinen diese Bereiche in der Farbkodierung fälschlicherweise besonders prominent. Die Tatsache, dass die Signale vom Adhäsionsmuster im Zellausläufer deutlich zu erkennen sind und keine Defokussierung aufweisen, zeigt allerdings, dass die Bilder an sich der bisher gezeigten, hohen mikroskopischen Qualität entsprechen.

Im Gegensatz zu den vorher beobachteten Retraktionsvorgängen wurde in diesem Fall keine türkis-blaue Färbung beobachtet, was darauf hindeutet, dass diese Retraktion sehr schnell verlaufen ist. Der Zentralbereich des Zellausläufers blieb stabil adhärent (weiß), während die Ränder grün erscheinen. Eine grüne Einfärbung bedeutet, dass das Signal nur auf dem mittleren Bild einer Dreierserie zu finden ist. Somit ist der Zellausläufer innerhalb von 15 Minuten schmaler geworden (Abbildung 19 D, E). In diesem Zusammenhang wurde auch die Mischfarbe lila (blau und rot) erstmalig beobachtet (E). Diese Farbe bedeutet, dass das Signal auf dem ersten und dritten Bild einer Serie detektiert wurde. Die beobachtete Zelle muss also einen Teil ihres Zellkörpers zurück über den noch adhärennten Ausläufer (E) verlagert haben. Dementsprechend war 3 Stunden später wieder deutlich mehr vom Zellkörper zu erkennen (F). Im Weiteren wanderte die Zelle ein Stück nach rechts (F-J), bevor sie endgültig nach oben den Bildausschnitt verließ (K-P).

Die folgenden 3 Stunden sind mit kleinstmöglicher Zeitauflösung dargestellt, da in diesem Zeitintervall ein Teil der Adhäsionspunkte des Zellausläufers als Zellspur zurückblieb (Abbildung 19 F-O). Die Zelle zog sich wie beschrieben zurück, wodurch der Zellkörper in dem bereits bekannten Saum aus türkis und blau erscheint (G-J). Dabei blieben die Adhäsionspunkte im Zellausläufer bestehen (weiß, F-P). Allerdings wurden nicht die kompletten Adhäsionspunkte zurückgelassen, sondern ihre Anzahl wurde von der Zelle reduziert (I), kurz bevor sie die Stelle endgültig verließ (J). Die danach noch vorhandenen Adhäsionspunkte blieben auf dem Substrat zurück (K-P). Die Zelle löste ihre Adhäsionen offensichtlich weitgehend auf (F-J). An den Stellen, wo dies nicht vollständig erfolgte, hinterließ sie das Material auf der Oberfläche. In den letzten 2 Stunden des Beobachtungszeitraumes kann man erkennen, dass die zurückgelassenen



Adhäsionspunkte stabil bleiben und sich nicht weiter verändern, obwohl noch eine Verbindung zur Zelle zu erkennen ist. Die Adhäsionspunkte sind mit dem Zellkörper der Zelle über dünne Schläuche verbunden (Abbildung 19 L-P).

Der hier beobachtete Prozess kann als Ablage einer Zellspur betrachtet werden, auch wenn das Produkt nicht der in der Literatur beschriebenen Morphologie von Zellspuren entspricht (Fuhr et al. 1998). Es konnte beobachtet werden, dass die Zellspur aus den Adhäsionspunkten des Zellausläufers entsteht. Um diese Korrelation genau zu belegen, wurde wieder die Farbkodierung modifiziert. Abbildung 20 zeigt den Zellausläufer der L929-Zelle in der veränderten Farbkodierung. Es wurden dreimal 6 Stunden zu einem Bild zusammengefasst und einmal der gesamte Beobachtungszeitraum in einem RGB-Bild darstellt.

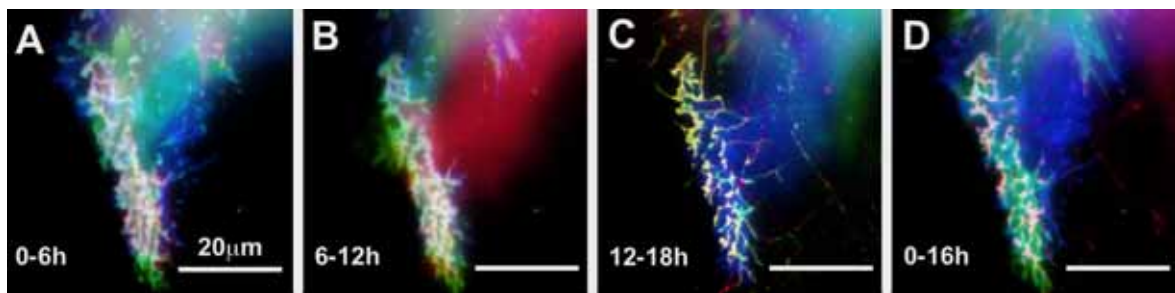


Abbildung 20: Darstellung der Entstehung der Zellspur aus dem Adhäsionsmuster des L929-Fibroblasten mittels der modifizierten Farbkodierung. Bilder A bis C stellen jeweils 6 Stunden dar (Farbkodierung:  $t = -6$  h,  $t = -3$  h und  $t = 0$  h). D zeigt ein Zeitfenster von 16 Stunden (Farbkodierung:  $t = -16$  h,  $t = -8$  h und  $t = 0$  h). Die ehemaligen Adhäsionspunkte bilden die Endpunkte der Zellspur.

In den ersten 6 Stunden erkennt man, dass der Zellkörper den Bildausschnitt verlassen hatte und der Zellausläufer schmaler wurde. (Abbildung 20 A, türkis, blauer Bereich). Das Adhäsionsmuster blieb dabei unverändert (A, weiße Punkte). In den nächsten 6 Stunden verlagerte die Zelle ihren Zellkörper zurück (B, roter Bereich). Das Adhäsionsmuster des Zellausläufers blieb davon unberührt (B, weiße Punkte). Die letzten 6 Stunden zeigen die Veränderung der Zellspur. Der Zellkörper ist vollständig aus dem Bildausschnitt verschwunden (türkis-blauer Bereich). Die stabilen Adhäsionspunkte bilden die Endpunkte der Zellspur (C, weiße Punkte). Die linearen Elemente der Spur, die die ehemaligen Adhäsionspunkte mit der Zelle verbinden, erscheinen rot. Das bedeutet, dass diese Bereiche der Spur erst nach dem Zurückziehen des Zellkörpers entstanden sind (C). Ein kleiner Teil der Adhäsionspunkte ist türkis gefärbt. Offensichtlich unterliegt die Spur einem Alterungsprozess, so dass Bereiche abgebaut werden und verschwinden. In der Darstellung der gesamten 16 Stunden erkennt man, welche Bereiche der Ursprungsadhäsion in der Zellspur wiederzufinden sind (D, weiße Bereiche). Diese Adhäsionspunkte sind gleichmäßig über den Zellausläufer verteilt.

Damit wurde gezeigt, dass die Zellspurentstehung direkt mit den stabilen Adhäsionsbereichen der Zelle im Zusammenhang steht. Die hier beobachtete Zellspur ist morphologisch nicht identisch mit den in der Literatur beschriebenen Spuren von

L929-Fibroblasten (Fuhr et al. 1998). Die dort beschriebenen Zellspuren sind länger und über den gesamten Bereich verzweigt. Die bisher für 3T3-Zellen beschriebenen Spuren beziehen sich nur auf das „near field“, also den direkten Anschluss der Spur an die Zelle. Für C2C12- und 3T3-Zellen ist allerdings auf Grund der Tatsache, dass sie ein anderes Adhäsionsmuster besitzen, eine andere Spurmorphologie zu erwarten als die bei L929-Zellen zu beobachtende.

Da es sich bei den CHO-Epithelzellen um eine nichtmigrierende Zelle handelt, wurden diese Zellen im Folgenden aus der Untersuchung ausgenommen. Zur Charakterisierung der Grundmorphologie der Zellspuren bei den verbleibenden drei Zelllinien wurden Zellspuren in der Calceinfärbung mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommen. Die Tatsache, dass Zellspuren mit Calcein gefärbt werden können, deutet auf eine intakte Zellmembran der Spuren hin. Bei einer Verletzung der Membran könnte der Farbstoff nicht in der Spur verbleiben (s. 4.2.3.1). Abbildung 21 zeigt die Morphologie der Zellspuren und die Übergänge aus den Adhäsionsmustern in die Spuren bei L929-, C2C12- und 3T3-Zellen.

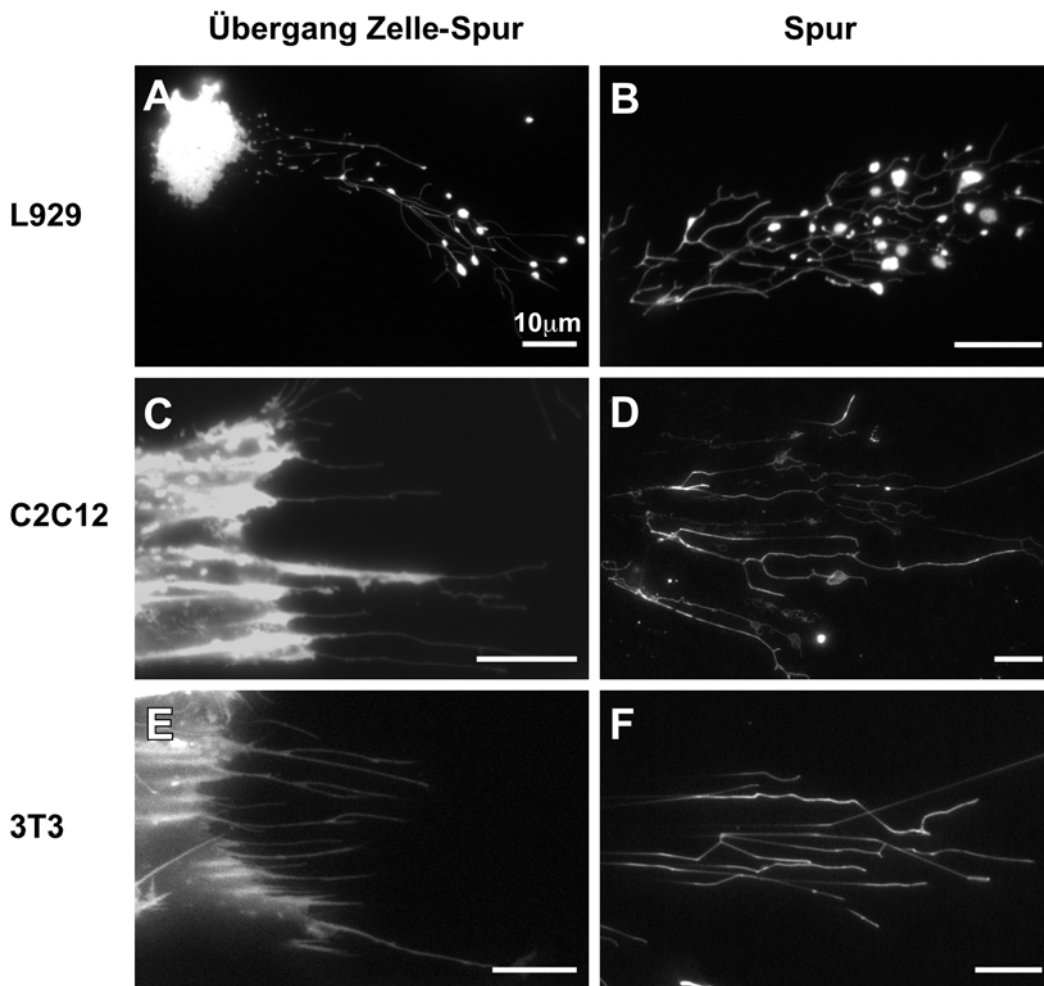


Abbildung 21: Übergang Zelle-Spur (A, C, E) und abgelegte Zellspur (B, D, F) der verschiedenen Zelllinien aufgenommen mittels Calcein TIRF-Mikroskopie. A, B: L929-Fibroblasten hinterlassen reich verzweigte Zellspuren mit Knotenpunkten. Das „near field“ ist punktförmig (Abbildung 15, D). C, D: C2C12-Muskelzellen hinterlassen parallele, kaum verzweigte Spuren, die in dem riefenförmigen



Adhäsionsmuster der Zelle ihren Ausgangspunkt haben (C). E, F: Spuren von 3T3-Fibroblasten ähneln denen der C2C12-Zellen (C-F).

Ein L929-Fibroblast wurde während der Zellspurablage aufgenommen (Abbildung 21 A). Das Adhäsionsmuster der Zelle selbst ist nicht zu erkennen, da die Aussteuerung bei der Bildaufnahme auf die Spur eingestellt wurde. Im „near field“ der Spur sind ausschließlich punktförmige Adhäsionen zu erkennen (A). Die eigentliche Spur unterteilt sich in den reich verzweigten Anfangsbereich („far field“) und einen kurzen, weniger verzweigten Übergangsbereich, das „transitional field“. Viele der Verzweigungs- bzw. Endpunkte weisen Verdickungen auf und sind deutlich größer und heller als der Rest der Spur. In Abbildung 21 B ist eine ausgeprägtere Spur mit gleicher Morphologie vergrößert dargestellt. Die zweite Spur ist insgesamt größer. Das „transitional field“ ist etwas verzweigter als bei der ersten Spur (A), in beiden Fällen aber recht kurz.

Die Zellspuren der beiden anderen Zelllinien unterscheiden sich deutlich von Zellspuren der L929-Zellen (Abbildung 21 C-F). Die Zellspur von C2C12-Muskelzellen ist nicht so reich verzweigt und besteht aus parallelen Schläuchen (D). In diesem Fall sind drei Ansätze zu erkennen, die jeweils ein- bis zweimal verzweigt sind. Weder an den Verzweigungs- noch an den Endpunkten sind Verdickungen zu beobachten. Das „near field“ am Übergang zur Zelle (C) zeigt eine Möglichkeit auf, wie diese Unterschiede zu Stande kommen. Die C2C12-Zelle besitzt ihr typisches riefenförmiges Adhäsionsmuster (C). Die Zellmembran ist von Riefe zu Riefe leicht nach innen gekrümmt, wie das bereits bei der Retraktion von C2C12-Zellen beobachtet wurde (s. Abbildung 17). Als Verlängerung jeder Riefe ist der Ansatz einer Zellspur zu erkennen. Zwar endet normalerweise jede Riefe in einer Spur, jedoch sind bei der mittleren Riefe zwei Spuransätze zu erkennen (Abbildung 21 C). Die Spuransätze sind noch sehr kurz und nicht als vollständige Spur anzusehen. 3T3-Fibroblasten hinterlassen ähnliche Zellspuren wie C2C12-Muskelzellen. Die Spur ist nahezu unverzweigt und beginnt in mehreren parallelen Ursprungsorten (F). Der direkte Übergangsbereich zeigt kurze Spuransätze, die in den Adhäsionsriefen beginnen (E).

### **5.4.2 Korrelation der Adhäsionsmuster mit der Morphologie der Zellspur**

Die bisherigen Untersuchungen der Unterschiede im Adhäsionsmuster der Zelllinien vermitteln den Eindruck, dass die zellspezifischen Adhäsionsmuster Einfluss auf die Zellspurmorphologie haben. Um diese Annahme zu untersuchen wurde der Prozess der Zellspurentstehung bei den drei wandernden Zelllinien direkt mittels Zeitraffer-TIRF-Mikroskopie verfolgt. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den zellspezifischen Adhäsionsmustern und der Zellspurmorphologie hergestellt werden. Abbildung 22 stellt die Dynamik des Adhäsionsmusters einer L929-Zelle während der Entstehung einer Zellspur dar.

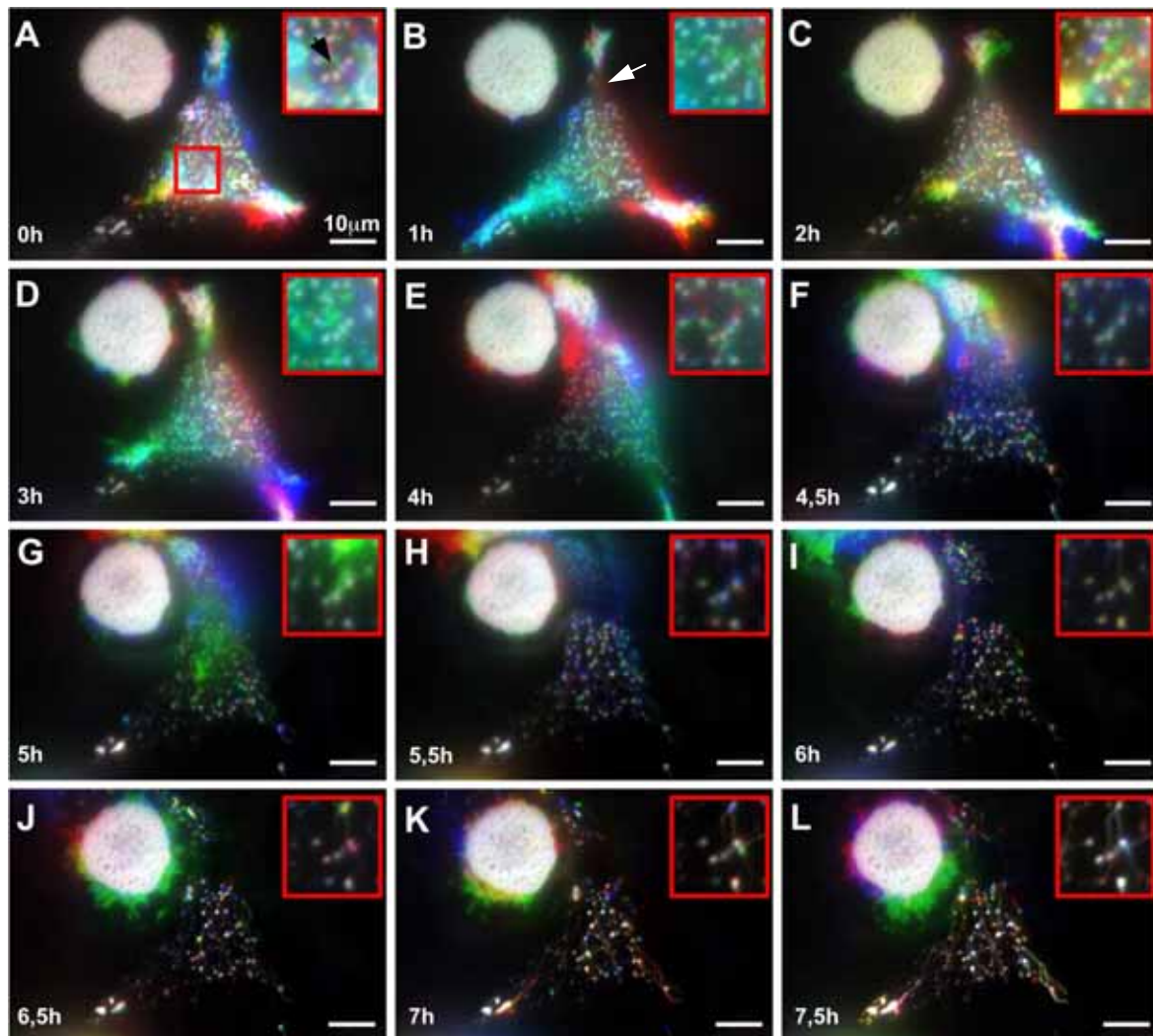


Abbildung 22: Zeitrafferstudie der Zellspurentstehung aus dem Adhäsionsmuster einer DsRed-transfizierten L929-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Zelle adhärirt 4 Stunden an einer Stelle und fluktuiert (A-E). Dann beginnt sie zu migrieren und wandert nach oben aus dem Bildfeld (F-L). Währenddessen wird eine Zellspur zurückgelassen. Die Morphologie des „far field“ ist mit dem Adhäsionsmuster identisch (A und L). Ein charakteristischer Bereich wurde vergrößert dargestellt (A, roter Rahmen).

Im Bildfeld sind zwei Zellen zu erkennen. Die linke Zelle ist abgerundet und bewegt sich nicht. Lediglich am Ende des Beobachtungszeitraums sind kleine Fluktuationen zu erkennen (Abbildung 22 J-L). Daher wird diese Zelle nicht weiter betrachtet. Der weitaus interessantere L929-Fibroblast hat eine dreieckige Form. Die Adhäsion ist in der Mitte der Zelle punktförmig, an den Ecken flächig. Die Zelle adhärirte in den ersten 3 Stunden der Beobachtung auf einer Stelle und bildete in den drei Ecken abwechselnd flächige Adhäsionsbereiche aus (A-D). Danach wanderte sie nach oben aus dem Bildfeld und hinterließ eine Zellspur. Im zentralen Bereich der Zelle sind über die gesamte Fläche stabile Adhäsionspunkte zu erkennen (A, weiße Punkte).

Um das zentrale Adhäsionsmuster besser analysieren zu können wurde ein charakteristischer Bereich vergrößert dargestellt (Abbildung 22 A, rotes Quadrat). Dort befinden sich vier Adhäsionspunkte in einer Reihe übereinander (A, Pfeil). Diese Punkte sind das zentrale Element einer Anordnung von mehreren Adhäsionspunkten (2 hinter dem Pfeil, 4 vor dem Pfeil und 2 unterhalb der ersten 2 Punkte aus der Vierergruppe), die über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten bleiben.

Zuerst wurde die Adhäsion von der Zelle in der rechten Ecke verstärkt (rot), während in der linken Ecke nur die Adhäsionspunkte zu erkennen sind (Abbildung 22 A). Der Zellkörper liegt außerhalb des TIRF-Anregungsfelds. Daran schließt sich ein Bereich an, der gelb gefärbt ist, also in den letzten beiden Bildern fluoresziert hat. Die obere Zellecke erscheint türkis-blau auf Grund von verminderter Adhäsion. Ein ähnliches Adhäsionsbild zeigt sich in den nächsten 3 Stunden (B-D). Die rechte untere Ecke der Zelle ist ein Bereich, der sehr stark adhärent ist. Zu den ersten drei gewählten Zeitpunkten ist er konstant weiß gefärbt (A-C). Nach 3 Stunden begann die Zelle nach oben aus dem Bildausschnitt zu wandern. Die beiden unteren Ecken erscheinen daher grün und blau (D). Dieser Prozess setzte sich über die nächsten 2 Stunden fort, bis die Zelle das Bildfeld komplett verlassen hatte. In der Farbkodierung spiegelt sich dieser Vorgang in türkis-blauen Tönen wieder (E-H).

Die charakteristischen Adhäsionspunkte (rotes Quadrat) blieben während der ersten 3 Stunden vollkommen unverändert (Abbildung 22 A-D, weiße Punkte). Die im Bildausschnitt zu erkennende Farbe rührt daher, dass die Hintergrundfluoreszenz des Zellkörpers über den Adhäsionspunkten nicht stabil ist und daher verschieden farbig eingefärbt wird. Nach 4 Stunden Beobachtung zog sich der Zellkörper immer weiter zurück und der farbige Hintergrund verschwindet (F-L). Die Zelle bewegte sich in den ersten Stunden um die stabilen Adhäsionspunkte herum. Dabei wurden neue Adhäsionspunkte gebildet (A, C; rote Punkte) und alte teilweise abgebaut (A-C; blaue Punkte). Nachdem die Zelle ihre ursprüngliche Position verlassen hatte, blieb ein Punktmuster aus Adhäsionen zurück, die dem originalen Umriss der Zelle entsprechen (H-L). Im Laufe der beobachteten folgenden 2 Stunden verschwanden noch einige Adhäsionspunkte, der größte Teil blieb aber erhalten (rotes Quadrat). Allerdings erscheinen die Adhäsionspunkte farbig (I-K). Das bedeutet, dass die detektierten Signale sich zeitlich änderten, obwohl die Zelle diese Stelle bereits verlassen hatte. Die erwartete weiße Färbung ist erst wieder im letzten Bild des Beobachtungszeitraums zu sehen (L, rotes Quadrat).

Zellspuren, bestehend aus Linienelementen und Verzweigungen, sind erst in der letzten halben Stunde des Beobachtungszeitraumes (Stunde 7 bis Stunde 7,5) zu erkennen. Nach 7 Stunden treten die ersten Schläuche auf, die die Adhäsionspunkte miteinander verbinden (Abbildung 22 K). Innerhalb der nächsten halben Stunde werden diese Signale stärker, so dass am Ende aus den Adhäsionspunkten das verzweigte „far field“ einer Zellspur entstanden ist (L). Dieser Prozess erfolgt mit einer hohen zeitlichen Korrelation.

Über den gesamten ehemaligen Adhäsionsbereich der Zelle werden die Linienelemente der Zellspur zum gleichen Zeitpunkt detektiert.

Die hier entstandene Zellspur entspricht von der Morphologie her den statisch aufgenommenen Zellspuren von L929-Zellen (s. Abbildung 21). Die stabilen Adhäsionspunkte geben den Ausschlag für die Morphologie der Zellspur. Wenn die Zelle einen Ort verlässt, an dem sie stark gehaftet hat, also viele Adhäsionen aufgebaut hatte, lässt sie einen Teil ihrer Adhäsionspunkte zurück, die dann von dünnen Membranschläuchen verbunden eine Zellspur ergeben. Im oberen Bereich der Zelle gibt es einen Bereich, an dem kaum Adhäsionspunkte zu sehen sind (Abbildung 22 B, weißer Pfeil). In diesem Bereich werden anschließend keine Adhäsionspunkte zurückgelassen. Die Zellspur besteht dort nur aus zwei Schläuchen, die den Bereich überspannen (L).

Die beobachtete Intensitätszunahme bei den Linienelementen der Zellspur ist ein unerwarteter interessanter Effekt, der daher näher untersucht wurde. Dazu wurde der optische Eindruck mittels ImageJ quantifiziert. In einem Bereich von 3 x 3 Pixeln bei Adhäsionspunkten und 2 x 5 Pixeln bei Linienelementen wurden die Fluoreszenzintensitäten vermessen und anschließend gemittelt. Um nur die Änderung der Fluoreszenzintensität zu betrachten, wurden die so erhaltenen Absolutwerte auf den Faktor 1 normiert. Es ist zu klären ob die Intensitätszunahme bei den Linienelementen ein Artefakt beispielsweise verursacht durch Schwankungen in der Beleuchtungsintensität darstellt. Daher wird die Intensitätsänderung bei den Adhäsionspunkten als Kontrolle untersucht. Die folgenden Diagramme zeigen an Beispielen, wie sich die Fluoreszenzintensität in der Zellspur ändert. Es wurden immer Adhäsionspunkte mit in der Nähe liegenden bzw. direkt anschließenden Linienelementen der Zellspur verglichen. In Abbildung 23 sind an Hand von Beispielen aus den verschiedenen Bereichen der Zellspur die Ergebnisse dieser Untersuchung gezeigt.

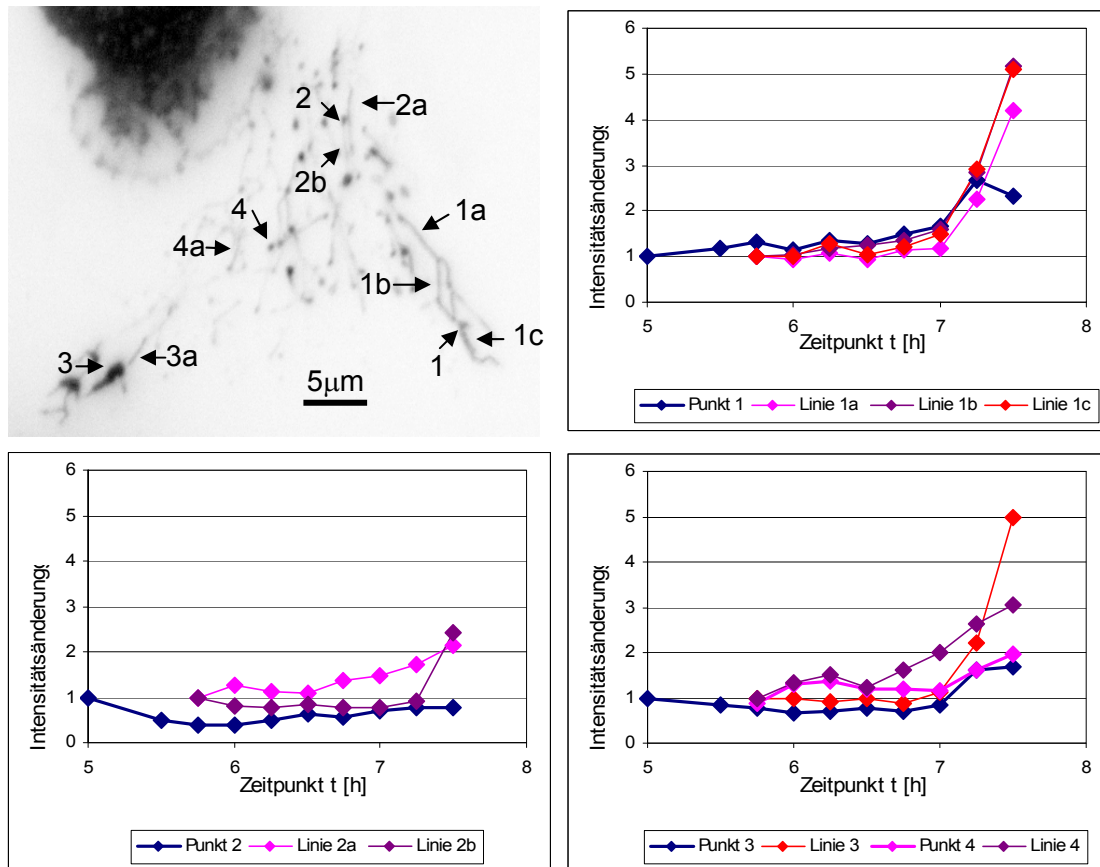


Abbildung 23: Vergleich der normierten Intensitätsänderung in Adhäsionspunkten und anschließenden bzw. benachbarten Linienelementen der in Abbildung 22 von einem L929-Fibroblasten hinterlassenen Zellspur. In Abbildung 23 A ist die Zuordnung der Graphen zu den einzelnen Adhäsionspunkten und Linienelementen aus den verschiedenen Bereichen der Zellspur gezeigt.

In Abbildung 23 erkennt man, dass nicht nur die Linienelemente der Zellspur einer Intensitätsänderung unterliegen, sondern auch die Adhäsionspunkte. Allerdings ist die Änderung der Intensität bei den Linienelementen um den Faktor zwei oder mehr größer, als bei benachbarten Adhäsionspunkten. Teilweise ist sogar eine leichte Verringerung der Intensität bei den Adhäsionspunkten zu beobachten (Abbildung 23 C, Punkt 2). Zudem ist festzustellen, dass die Intensitätsänderung an verschiedenen Orten in der Zelle unterschiedlich stark ist. Daher ist ein Artefakt durch Zunahme der Beleuchtungsintensität als Erklärung für diese Beobachtung auszuschließen. In diesem Fall müsste an verschiedenen Bereichen der Zelle und bei Adhäsionspunkten und Linienelementen der Zellspur die gleiche Intensitätsänderung gemessen werden. Demgegenüber kann die Intensitätszunahme auf die Anregung mit dem evaneszenten Feld zurückgeführt werden. Auf Grund des exponentiellen Abfalls der Feldintensität mit steigendem Abstand von der Substratoberfläche kann die Intensitätszunahme durch ein Absinken der Struktur im evaneszenten Feld verursacht werden. Bei der Zellspur des L929-Fibroblasten ist zu beachten, dass die Intensität der Linienelemente stärker zunimmt, als die der Adhäsionspunkte. Auf Grund des TIRF-Feldes kann man daraus schließen, dass beide Strukturen sich der Substratoberfläche nähern, die Linienelemente der Zellspur aber

stärker absinken als die Adhäsionspunkte. Interessant ist, dass dieser Prozess in allen Bereichen der Zellspur zum gleichen Zeitpunkt stattfindet.

Die Morphologie der Zellspuren von L929-Zellen konnte direkt mit dem punktförmigen Adhäsionsmuster korreliert werden. Handelt es sich bei dieser Beobachtung um ein generelles Prinzip, müsste auch die Morphologie von Zellspuren der Zelllinien 3T3 und C2C12 mit dem riefenförmigen Adhäsionsmuster der Zellen im Zusammenhang stehen. In Abbildung 21 wurde bereits gezeigt, dass ein morphologischer Unterschied zwischen den Spuren von L929-Fibroblasten und den Spuren der Zellen mit riefenförmigem Adhäsionsmuster besteht. Die Zellspuren von 3T3- und C2C12-Zellen sind unverzweigt und bestehen aus parallelen Schläuchen. Daraus ergibt sich die Frage, wie die Zellspurbildung bei den Zellen mit Adhäsionsriefen erfolgt. In Abbildung 24 ist ein 3T3-Fibroblast bei der Zellspurbildung dargestellt.

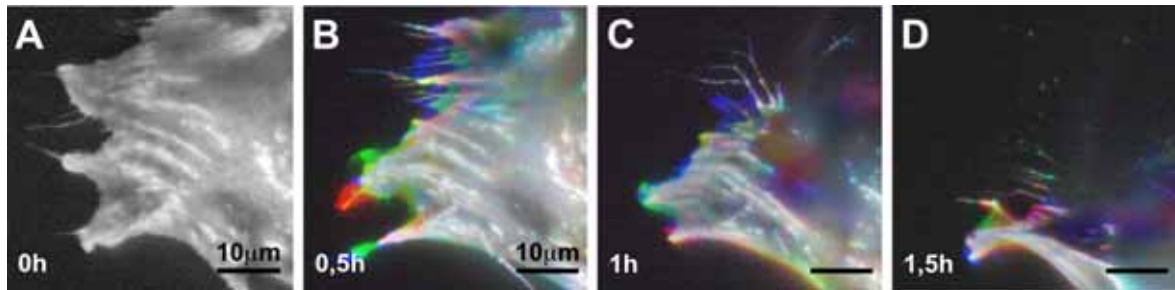


Abbildung 24: Zeitrafferstudie der Zellspurentstehung aus dem Adhäsionsmuster einer DsRed-transfizierten 3T3-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. Die Einzelbilder B-D ergeben sich aus einer modifizierten Farbkodierung (Bildabstand 3 Minuten). Damit zeigt ein Bild 6 Minuten Zeitintervall. Das Riefenmuster der Adhäsion ist der Ausgangspunkt für die Zellspuren, die als parallele Schläuche zurückgelassen werden, während die Zelle sich zurückzieht (B). Eine untransfizierte Zelle stört die Beobachtung (C, D).

Der 3T3-Fibroblast zeigt ein typisches Adhäsionsmuster mit Riefen (Abbildung 24 A). Zur besseren Visualisierung wurde nur der dynamische Bereich der Zelle dargestellt. Die Membran ist von Riefe zu Riefe nach innen gekrümmt (A), wie das bereits mehrfach bei der Retraktion von Zellen beobachtet wurde (s. Abbildung 17 und Abbildung 21). In der Farbdarstellung erkennt man den zurückgezogenen Teil der Zelle in blau, während die Zellspur in weiß zurückbleibt (Abbildung 24 B). Da die Zelle nicht nur nach rechts, sondern auch gleichzeitig nach unten aus dem Bildfeld heraus wanderte, überlagerten sich zwei Bewegungen (C, D). Die Zelle verschwand sprunghaft nach unten, so dass die waagrecht gebildeten Spuransätze aus den Riefen nur sehr kurz blieben (C, D). Zusätzlich störte eine nicht transfizierte Zelle die Beobachtung und verdeckte Signale, so dass man in allen Bildern nur den Randbereich der Zelle erkennen kann, in dem Zellspuransätze als Verlängerung der Riefen zu sehen sind (C). Nach 1,5 Stunden hatte die Zelle das Bildfeld fast vollständig verlassen. Die entstandenen Spuren sind zum Teil von der nicht transfizierten Zelle überdeckt (D). Auf Grund der Kürze der Spur handelt es sich hier noch nicht um die Ablage einer vollständigen Spur, sondern eher um die Entstehung der Spur im „near field“.



Wie eben in Ansätzen beim 3T3-Fibroblasten gezeigt wurde, entstehen die Zellspuren als Verlängerung aus den Adhäsionsriefen. Abbildung 25 stellt nun den vollständigen Prozess der Zellspurentstehung bei C2C12-Muskelzellen dar.

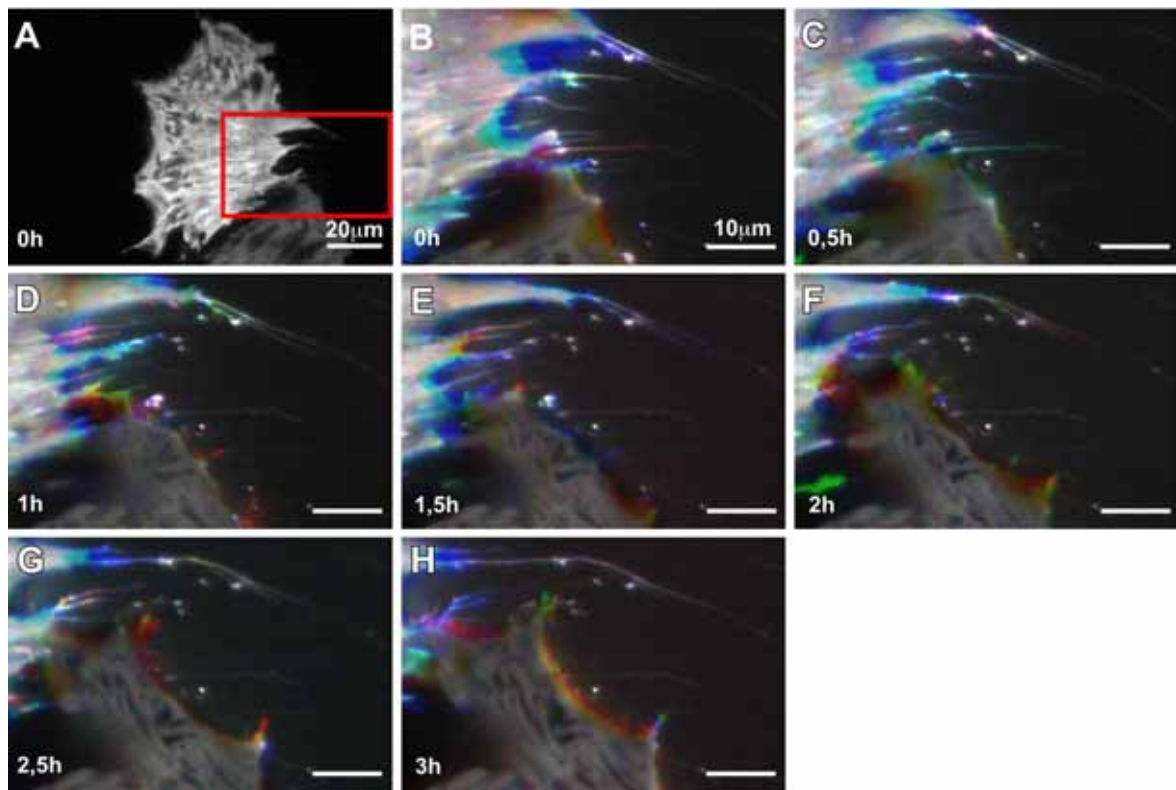


Abbildung 25: Zeitrafferstudie der Zellspurentstehung aus dem Adhäsionsmuster einer DsRed-transfizierten C2C12-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle im Überblick. Der Retraktionsbereich der Zelle (A, rotes Quadrat) wird vergrößert dargestellt. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Zelle besitzt ein riefenförmiges Adhäsionsmuster (A). Aus den Enden der Riefen entstehen die Zellspuren (B-F).

Die beobachtete C2C12-Zelle zeigt ein typisches, riefenförmiges Adhäsionsmuster, das parallel zur Wanderungsrichtung verläuft. In diesem Falle entsprach die Wanderungsrichtung nicht der Längsachse der Zelle, sondern die Zelle migrierte über ihre Querachse (Abbildung 25 A). Zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin änderte die Zelle ihre Bewegungsrichtung und migrierte in Richtung des unteren Bildrandes. Am hinteren Ende des Zellkörpers ist, vergrößert dargestellt, bereits als Verlängerung der Adhäsionsriefen das „near field“ einer Zellspur zu erkennen (B). Die Zelle zeigt die typische Farbgebung einer Retraktion, wobei die Zellmembran von Riefe zu Riefe nach innen gekrümmt ist. Der Zellsaum erscheint türkis-blau (B-D) und viele parallele Ansätze von Zellspuren werden beim Zurückziehen der Zelle zurückgelassen. Aus der obersten Riefe bilden sich hier ausnahmsweise zwei Zellschläuche, obwohl üblicherweise immer nur ein Zellschlauch gebildet wird. Die unterste Zellspur ist im Gegensatz zu sonst nicht gleich weiß gefärbt, sondern erscheint erst rot (B), dann türkis (C) und zum Schluss weiß (D). Dieser Farbverlauf wird beobachtet wenn sich die Lage der Riefe verändert hat, während die Zelle den Zellkörper zurückzog. Dabei wurde die Spur lateral leicht

verschoben. In den folgenden 2 Stunden zog sich die Zelle weiter zurück, wodurch die Spuren weiter verlängert wurden (E-H).

Die Beobachtung dieses Prozesses wurde dadurch erschwert, dass von unten eine zweite Zelle ins Bild gewandert war (B-H). Die zweite Zelle wanderte ebenfalls parallel zur Lage ihrer Adhäsionsriefen (F-H). Zusätzlich verbreiterte sie sich über die Querseite leicht, so dass die begrenzenden Fasern erst rot und anschließend gelb erscheinen (G, H). Die zweite Zelle wanderte über den unteren Teil der von der ersten Zelle hinterlassenen Zellspur, der somit am Ende des Beobachtungszeitraums nicht mehr sichtbar ist (F-H). Eine Ausnahme bildet der unterste Zellschlauch, der länger als die zweite Zelle ist und daher rechts von der Zelle wieder zu sehen ist (E-H). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Zellspur nicht zerstört wurde, während die zweite Zelle darüber hinweg wanderte. Die oberste Riefe hinterlässt eine gut sichtbare Spur von fast 50  $\mu\text{m}$  Länge. Dieser Spurteil ist sehr stabil und auch nach 3 Stunden noch deutlich zu erkennen.

C2C12-Zellen bilden Zellspuren, indem der Zellkörper zurückgezogen wird und die Riefe bzw. das darin lokalisierte Aktin auf dem Substrat zurückbleiben. Das führt zu den bogenförmigen Zellrändern und ist darauf zurückzuführen, dass am Ende der Adhäsionsriefen Adhäsionsstrukturen mit dem Substrat verbunden bleiben. Die Riefen bleiben dadurch in ihrer Position zum Substrat unverändert und werden von der Zelle während der Retraktion nicht mitgenommen oder abgebaut. Die Adhäsionsriefen gehen dabei direkt in die Zellspur über, im Gegensatz zur Zellspur von L929-Fibroblasten, bei denen die Linienelemente erst nachträglich zu sehen waren.

In allen drei Zelltypen konnte gezeigt werden, dass das Adhäsionsmuster die Morphologie der Zellspur bestimmt und an ihrer Entstehung elementar beteiligt ist. Während des aufgenommenen Beobachtungszeitraums blieben alle Zellspuren als kontinuierliche Spuren erhalten und unterlagen keinen typischen Degradierungsprozessen, wie z. B. dem durch Entnetzung verursachten Auftreten von kugelförmigen Strukturelementen.

### **5.4.3 Aktindynamik während der Entstehung von Zellspuren**

Abbildung 11 belegt, dass das Adhäsionsmuster einen Abdruck des Aktinzytoskeletts darstellt. Dieses Ergebnis wird untermauert durch frühere Untersuchungen in denen gezeigt wurde, dass Zellspuren in ihren kontinuierlichen Bereichen Aktin enthalten (Fuhr et al. 1998). Diesem Ansatz folgend wurde die Aktindynamik während der Zellspurbildung beobachtet. Die Transfektion mit Aktin-GFP-DNA war in allen drei Zelltypen möglich. Jedoch konnte nur bei C2C12-Muskelzellen die Entwicklung des Aktinzytoskeletts während der Zellspurbildung mittels TIRF-Mikroskopie beobachtet werden, da L929- und 3T3-Fibroblasten nach der Transfektion nicht mehr migrierten. Dieser Prozess ist in Abbildung 26 dargestellt.



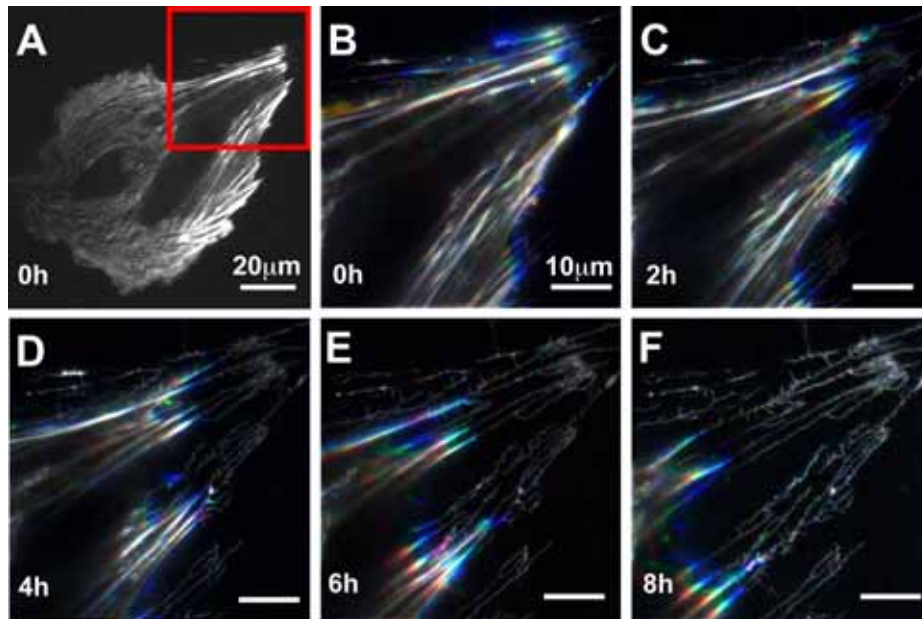


Abbildung 26: Zeitrafferstudie der Zellspurentstehung einer Aktin-GFP-transfizierten C2C12-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle im Überblick. Der Retraktionsbereich der Zelle (A, rotes Quadrat) wird vergrößert dargestellt. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Aktinfasern verlaufen parallel entlang der Migrationsrichtung der Zelle (A). Während der Retraktion des Zellendes entsteht eine Zellspur (B-F).

Das Aktinskelett der C2C12-Zelle besteht aus langen, parallelen Fasern, die sich entlang der Zelllängsachse durch die ganze Zelle erstrecken (Abbildung 26 A). Die Zelle wanderte durch das Beobachtungsfeld und hinterließ dabei eine Zellspur aus Aktin (F). Der vergrößerte Bereich (A, rotes Quadrat) zeigt den Retraktionsbereich der Zelle, in dem die Zellspur entstanden ist (B-F). Die Position der einzelnen Aktinfasern bleibt dabei stabil (B-D, weiße Fasern.) Werden die Fasern zurückgezogen oder verkürzt, erscheinen sie türkis und blau (B-F). Allerdings sind bei einigen Fasern auch rote, d. h. neue Bereiche zu erkennen (E, F). Das erklärt sich daraus, dass die Zelle nicht diagonal durch das Bild migrierte, sondern sich leicht nach links orientiert hat. Diese Drehung führte zu einer leichten Verlagerung der Aktinfasern, die dadurch rot erscheinen. Aktin wird während der Retraktion des Zellkörpers nicht vollständig abgebaut, sondern ein Teil bleibt als Zellspur zurück (F). Dabei entsteht eine Spur, die aus langen, unverzweigten und parallelen Fasern besteht. Die abgelegte Zellspur ist sehr stabil und verändert sich nach der Ablage innerhalb von 24 Stunden nicht mehr (Aufnahmen nicht gezeigt). Die Morphologie der Aktinzellspur entspricht der genauen Lage des Aktinskeletts in der Zelle, bevor sie mit der Migration begonnen hat (B, F).

#### 5.4.4 Beeinflussung der Morphologie von Zellsuren mittels einer modifizierten Oberfläche

Bei der Beobachtung der Mechanismen, die zur Bildung einer Zellspur führen, wurde die Morphologie eindeutig mit der Form des Adhäsionsmusters in Verbindung gebracht. Das

legt die Vermutung nahe, dass eine Veränderung des Adhäsionsmusters auch die Morphologie der Zellspuren beeinflusst. Im Rahmen der technischen Nutzung von Zellspuren wäre es beispielsweise wünschenswert für alle Zelltypen lange parallele Zellspuren zu erzeugen, so dass je ein Membranschlauch für verschiedene Parallel-Analysen verwendet werden könnte. Eine Modifikation der Substratoberfläche bietet sich zur Änderung des Adhäsionsverhaltens der Zellen an. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Beschichtung mit dem ECM Protein Fibronektin (FN) die Morphologie einer Zellspur von L929-Fibroblasten ändern kann (Fuhr et al. 1998). Hier konnte gezeigt werden, dass der Einfluss der Beschichtung zu einem riefenförmigen Adhäsionsmuster bei L929-Fibroblasten führt.

Bevor näher auf die Ergebnisse eingegangen wird, werden kurz die leicht veränderten Versuchsbedingungen beschrieben. Aus anderen Experimenten war bekannt (hier nicht gezeigt), dass das Ausbreiten der Zellen auf FN sehr schnell geschieht und die Zellen nach 2 Stunden zu migrieren beginnen. Da Kontrollexperimente ergaben, dass sich die Adhäsionsmuster nach 2 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden nicht unterscheiden, konnten die Adhäsionsmuster auf FN-beschichteten Oberflächen bereits nach 2 Stunden untersucht werden. In Abbildung 27 sind die beobachteten Änderungen im Adhäsionsmuster der Zellen und bei der Morphologie der Zellspuren dargestellt. Als Detektionsmarker wurde aus Gründen der einfacheren Handhabung auf Calcein zurückgegriffen.

Die Beschichtung der Substratoberfläche mit FN führte in allen Fällen dazu, dass die Zellen schneller hafteten. Bei C2C12-Zellen änderte sich aber am Grundmotiv der Adhäsionsmuster nichts. Die Zellen bildeten auf Glas wie auf FN parallele Riefen über die gesamte basale Zellmembran aus. Die Zellspuren bestanden in beiden Fällen aus langen parallelen Schläuchen und waren nicht verzweigt (Abbildung 27 B, D). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei den 3T3-Fibroblasten. Es wurden keine Unterschiede zwischen der Adhäsion auf Glas und auf FN beobachtet. Die Zellen bildeten in beiden Fällen ein riefenförmiges Adhäsionsmuster aus (E, G). Somit ist auch keine Veränderung bei der Morphologie der Spuren zu erkennen. Auf Glas wie auf FN bildeten sich lange, parallele und unverzweigte Spuren (H).

Im Gegensatz dazu hatte die Beschichtung bei L929-Zellen einen großen Einfluss. Insgesamt stieg die Anzahl der hinterlassenen Spuren bei L929-Fibroblasten stark an. Auf dem Glassubstrat erkennt man einen L929-Fibroblasten in der typischen Migrationsform (Abbildung 27 I). Die breite Zellfront ist stark adhärent und der Zellausläufer adhäriert punktförmig. Von der Zellmitte aus führen kurze Riefen sternförmig nach vorne in die Front (Abbildung 27 I). Diese Struktur entspricht der im Aktinskelett gefundenen sternförmigen Anordnung (s. Abbildung 12 D). Die korrespondierende Zellspur beginnt in einem Punkt und ist reich verzweigt. An den Endpunkten erkennt man Verdickungen, die heller fluoreszieren (Abbildung 27 J).

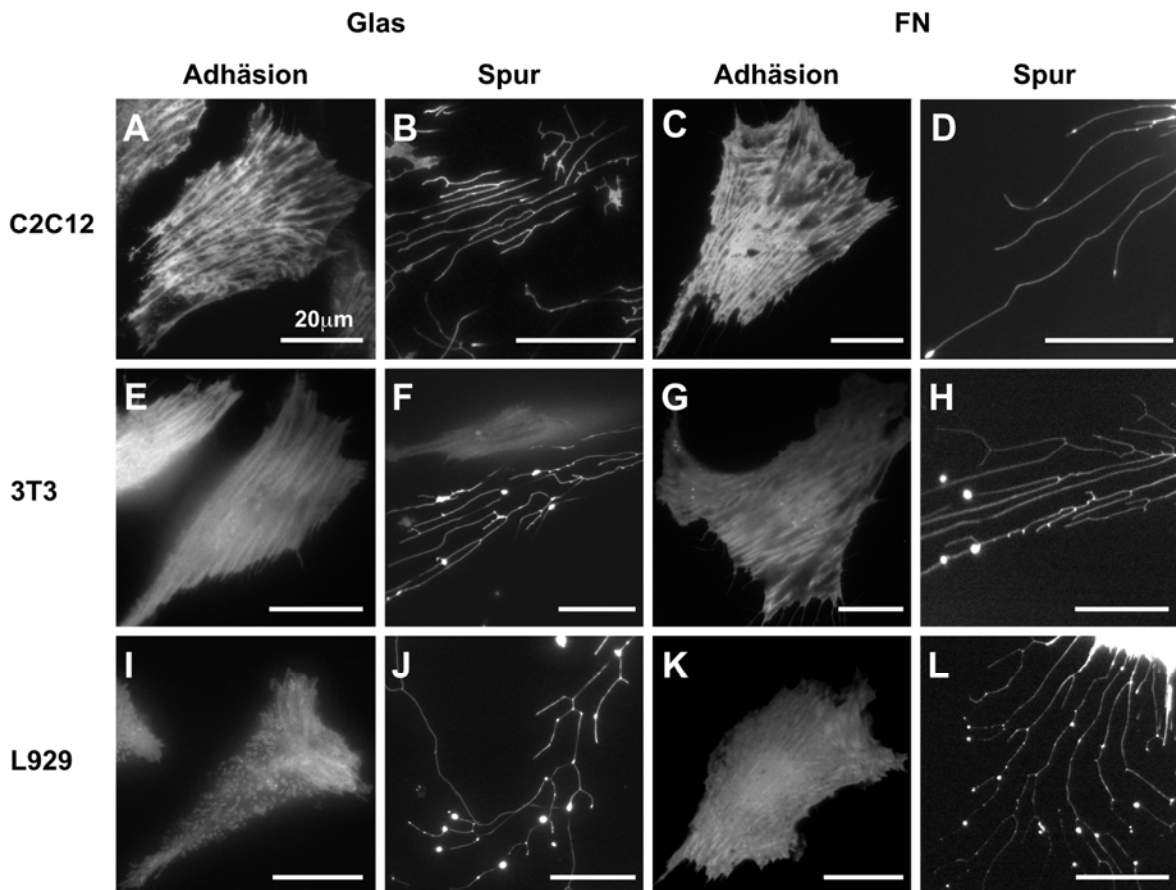


Abbildung 27: Einfluss der FN-Beschichtung auf die Adhäsionsmuster und die Spurmorphologie der Zellen nach Calceinfärbung detektiert mit TIRF-Mikroskopie. C2C12- und 3T3-Zellen zeigen auf Glas und FN das gleiche Adhäsionsmuster (C2C12: A, C; 3T3: E, G). Die Zellspurmorphologie ist unverändert (C2C12: B, D; 3T3: F, H). L929-Zellen zeigen im Gegensatz zur punktförmigen Adhäsion auf Glas (I) ein riefenförmiges Adhäsionsmuster auf FN (K). Die L929-Spur auf Glas ist reich verzweigt (J), die Zellspur auf FN besteht aus langen parallelen Schläuchen und ist weniger verzweigt (L).

Bei der Adhäsion auf FN stellt sich ein anderes Bild dar. Die typische Migrationsmorphologie ist verschwunden und die Zelle ähnelt von der Form her einer C2C12- oder 3T3-Zelle. Eine eindeutige Front ist nicht mehr zu erkennen, die Zelle hat eine rechteckige Form angenommen (Abbildung 27 K). Zusätzlich ist auch das Adhäsionsmuster verändert. L929-Fibroblasten bilden auf FN ein riefenförmiges Adhäsionsmuster aus (K). Die Riefen fluoreszieren nicht sehr hell, sondern sind sehr fein und nur schwach abgehoben gegen den Hintergrund. Das deutet daraufhin, dass die Zelle dicht am Substrat haftet. Es konnten sogar Zellen beobachtet werden, die kaum noch eine Adhäsionsstruktur aufwiesen. Die Zellspuren von L929-Zellen auf FN beginnen in den Adhäsionsriefen und sind parallel und relativ unverzweigt (L). Die Änderung der Adhäsionsmuster bei L929-Fibroblasten durch die Adhäsion auf FN, änderte ebenfalls die Morphologie der Zellspuren.

Da der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Adhäsionsmuster bereits gezeigt wurde (s. Abbildung 12), wurde ergänzend die Lage des Aktinzytoskeletts auf der FN-beschichteten Oberfläche mittels TIRF-Mikroskopie untersucht.

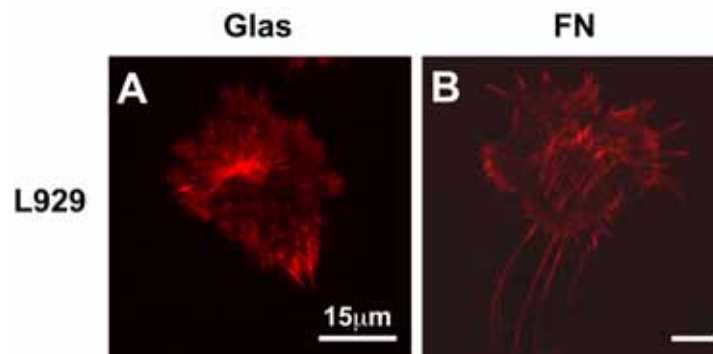


Abbildung 28: Einfluss der FN-Beschichtung auf die Anordnung des Aktinzytoskeletts in L929-Zellen. Das Aktinskelett wurde mit Phalloidin-Alexa 546 gefärbt und mittels TIRF-Mikroskopie analysiert. A: L929-Zelle auf Glas in Migrationsmorphologie. Aktinfasern aus der sternförmigen Anordnung in der Zellmitte führen in die Front. Der Zellausläufer erscheint punktförmig. Bei der Adhäsion auf FN ist das Aktinskelett in langen parallelen Fasern angeordnet (B). Die Form der Zelle ist quadratisch. Ansätze einer Zellspur sind als Verlängerung der Aktinfasern zu erkennen (B).

Das Aktinbild bei der Adhäsion auf Glas zeigt bis auf den zentralen Bereich nur Punkte. Im Zellschwerpunkt befindet sich eine sternförmige Anordnung von Aktinfasern, die in die Zellfront führt (Abbildung 28 A). Dieses Bild entspricht der Anordnung des Aktinzytoskeletts bei L929-Zellen während der Migration mit der typischen Migrationsmorphologie. Bei Adhäsion auf einer FN beschichteten Oberfläche ist das Aktinzytoskelett deutlich verändert. Die Zelle ist morphologisch nicht mehr dreieckig, sondern quadratisch, das Aktin durchspannt in langen parallelen Fasern die Zelle. Am hinteren Ende der Zelle befinden sich deutliche Ansätze von Zellspuren, die die Verlängerung des zellulären Aktins bilden (Abbildung 28 B, unten). Hier handelt es sich um fünf parallele Aktinfasern, die nicht weiter verzweigt sind. Die aus diesem Ansatz entstehende Zellspur wäre unverzweigt und würde aus parallelen Schläuchen bestehen.

## 5.5 Beeinflussung von Zelladhäsion und Zellmigration mittels strukturierter Oberflächen

Im Zusammenhang mit der Morphologie der Zellspuren wurde bereits die Glasoberfläche biochemisch durch die Beschichtung mit dem Protein FN aus der ECM verändert. Dadurch konnte Einfluss auf die Adhäsionsmuster und die Morphologie der Zellspuren genommen werden. Im Folgenden wird gezeigt, wie die Zellen auf eine Veränderung der Topographie der Oberfläche reagieren. In ersten Experimenten wurden verschiedene Strukturformen getestet. Die Größe der einzelnen Strukturelemente ist dem Größenbereich einzelner Adhäsionen angepasst. Bei den gezeigten Strukturen handelt es sich um Goldstrukturen (Ausnahme: Abbildung 30 A: Winkel aus Titan) auf der

Standardglasoberfläche. Die Oberflächen wurden nicht weiter verändert. In Abbildung 29 ist gezeigt, welchen Einfluss die strukturierten Oberflächen auf die Zellen nach 48 Stunden Adhäsion ausübten.

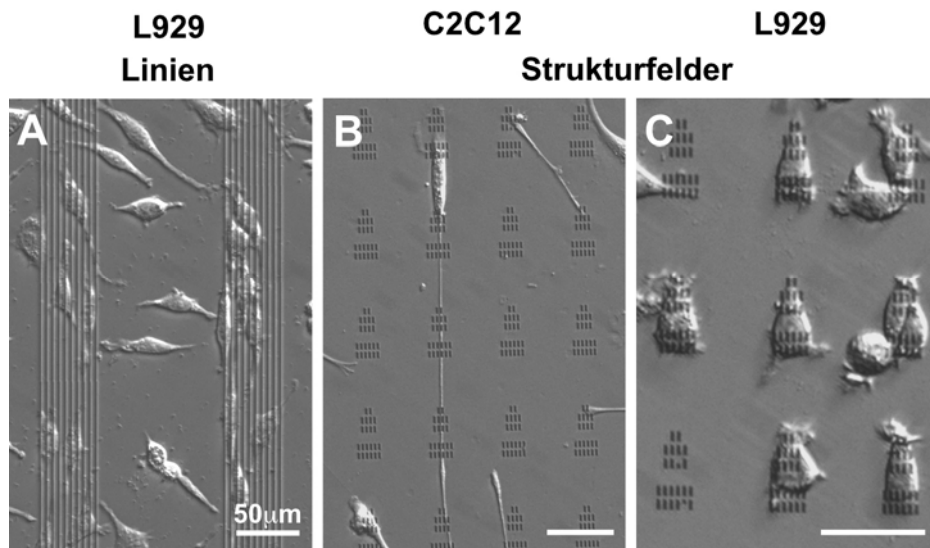


Abbildung 29: Verhalten von adhären Zellen auf topographisch strukturierten (80 nm Gold auf Glas) Substraten nach 48 Stunden im Relief-Contrast-Durchlichtverfahren. A: L929-Zellen richten sich an Linien aus. B: C2C12-Zellen wandern gerichtet über Strukturfelder. C: L929-Zellen adhären bevorzugt auf Strukturfeldern und übernehmen die Form der Strukturfelder.

Zellen reagieren auch auf eine topographische Strukturierung der Oberfläche. Bei der einfachsten Strukturform, mehreren parallelen Linien, ist zu erkennen, dass die L929-Fibroblasten (Abbildung 29 A) sich entlang der Linien ausrichten. Dabei nehmen die Zellen eine spindelförmige Form an. Zellen, die nicht auf der Struktur, sondern auf der Glasoberfläche adhären sind im Gegensatz dazu nicht ausgerichtet und dienen als Kontrolle.

Abbildung 29 B und C zeigen den Einfluss von Strukturfeldern. Die Form der Strukturfelder wurde einer migrierenden Zelle nachempfunden. Dabei ist zu erkennen, dass die Zellen die Strukturfelder zur Adhäsion bevorzugen. Die Fibroblasten adhären hauptsächlich auf den Strukturfeldern und nehmen dabei die Form der Struktur an (Abbildung 29 C). Bei den Muskelzellen konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Zellen bevorzugt auf den Strukturfeldern adhären. Da die C2C12-Zellen allerdings etwas größer als die L929-Fibroblasten sind, adhären sie auf mehreren Feldern gleichzeitig. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass C2C12-Zellen entlang der Strukturfelder migrieren. Dabei bildet sich ein langer, schlauchförmiger Zellausläufer, der von Strukturfeld zu Strukturfeld gespannt ist (B).

Mit einer nicht symmetrischen Anordnung von Winkelstrukturen konnte auch die Anordnung des Aktinzytoskeletts beeinflusst werden. Abbildung 30 zeigt die Aufnahmen aus dem CLS-Mikroskop.

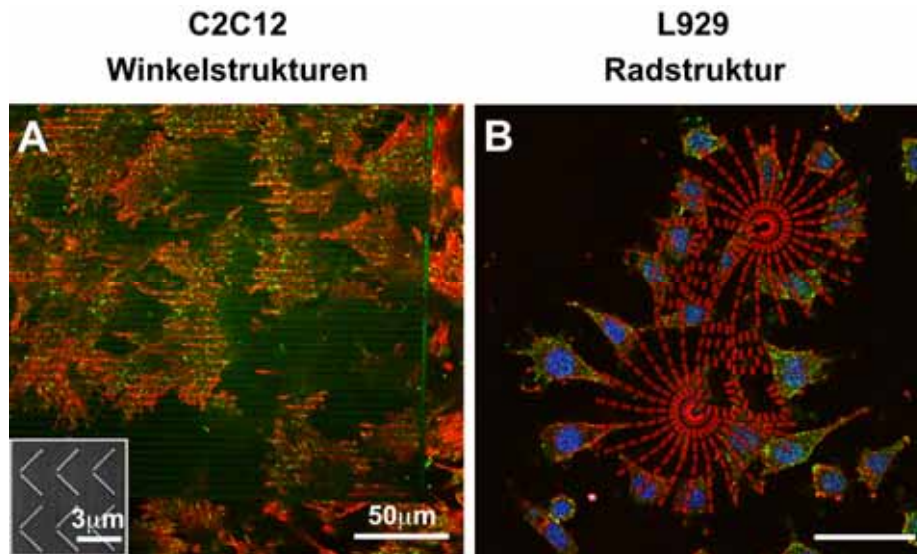


Abbildung 30: Einfluss von topographisch strukturierten Oberflächen (A: 80 nm Titanwinkel auf Glas, B: 80 nm Goldstruktur auf Glas) auf das Zytoskelett nach 48 Stunden Adhäsion der Zellen. Detektion des F-Aktin (rot), der FAK (grün) und der Kerne (blau) mittels CLS-Mikroskopie. A: Das F-Aktin von C2C12-Zellen wird entlang der Winkel ausgerichtet. B: L929-Zellen richten sich um eine Radstruktur aus.

Die Strukturierung der Substratoberfläche hat auch Einfluss auf die Anordnung des Aktinzytoskeletts. C2C12-Zellen adhären auf Winkelstrukturen. Bei den Winkelstrukturen ist zu beachten, dass es sich um eine gerichtete Struktur handelt. Da der Abstand zwischen den einzelnen Strukturteilen unterschiedlich groß ist, kommt eine pfeilförmige Struktur zu Stande, die mehrmals nebeneinander wiederholt wird. Durch diese Anordnung sollte eine Orientierung von rechts nach links für die Zellen vorgegeben werden. Der Einfluss der Winkelstruktur auf die Zellen richtet das F-Aktin in parallelen Fasern aus (Abbildung 30 A, rote Fasern). Die Zellen in den nichtstrukturierten Randbereichen dienen als Kontrolle. Bei der Adhäsion auf dem reinen Glas ist keine Vorzugsrichtung in der Anordnung des F-Aktins zu erkennen. Zusätzlich zum F-Aktin wurde als Protein der Adhäsionsstruktur die Fokale Adhäsions Kinase (FAK) gefärbt (Abbildung 30 A, grüne Signale). Die FAK ist meistens an den Enden der Aktinfasern lokalisiert. Die grüne Färbung der Struktur ist als Artefakt anzusehen und könnte beispielsweise durch Reflexionsphänomene zu erklären sein. Abbildung 30 B zeigt die Reaktion von Fibroblasten auf eine Radstruktur. Hier ordnen sich die Zellen entlang der Enden der Struktur kreisförmig an. Dabei fällt auf, dass die begrenzenden Aktinfasern der Zellen in den Randbereichen der Zelle häufig direkt auf den Strukturen enden (Abbildung 30 B, rote Fasern). Man erkennt, dass der Zellausläufer auf den Strukturen haftet oder die Zelle genau von zwei Strukturteilen begrenzt wird. Eine eindeutige Lokalisation der FAK ist nicht zu erkennen. Die Zellkerne erscheinen in blauer Färbung. In diesem Falle erscheint die Struktur in rot, was höchstwahrscheinlich ebenfalls auf Reflexionsphänomene zurück zu führen ist.

Mit den gezeigten Strukturen lassen sich Zellen in ihrem Adhäsions- und Migrationsverhalten gezielt beeinflussen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nicht zu klären, ob die rein topographische Veränderung des Substrates von den Zellen erkannt wird oder auch der chemische Kontrast zwischen den verschiedenen Oberflächen eine Rolle spielt.

### **5.6 Seltene Ereignisse im ventralen Aktinzytoskelett**

Während der Beobachtung von unstimulierten, mit Aktin-GFP-DNA transfizierten Zellen wurde eine interessante Entdeckung gemacht, die bisher noch nicht beschrieben ist. In den Zeitrafferaufnahmen tauchten immer wieder spontane Aktinakkumulationen auf. Die Häufigkeit ihres Auftretens unterlag starken Schwankungen. Innerhalb eines Tages konnten sie aber praktisch in jeder Aufzeichnung gefunden werden. Auf Grund ihrer optischen Erscheinung werden diese Aktinakkumulationen im weiteren Verlauf Aktinwolken und Aktinsterne genannt werden. Aktinwolken erschienen spontan in unterschiedlichen Bereichen der Zelle, wanderten durch die Zellen hindurch und verschwanden wieder. Dabei konnte eine Abnahme des Aktins in der lokalen Umgebung festgestellt werden. Die Aktinwolken waren in Größe und Form sehr vielfältig.

#### **5.6.1 Entstehung von Aktinsternen aus Aktinakkumulation bei L929-Zellen**

Ein Großteil der Aktinwolken verschwand allerdings nicht gleich wieder, sondern wurde in filamentöse Strukturen umgeformt. Dabei entstanden sehr helle Aktinzentren, von denen sternförmig Aktinfasern ausgingen. In Abbildung 31 ist die Entstehung einer solchen sternförmigen Aktinstruktur, im Folgenden Aktinstern genannt, dargestellt.



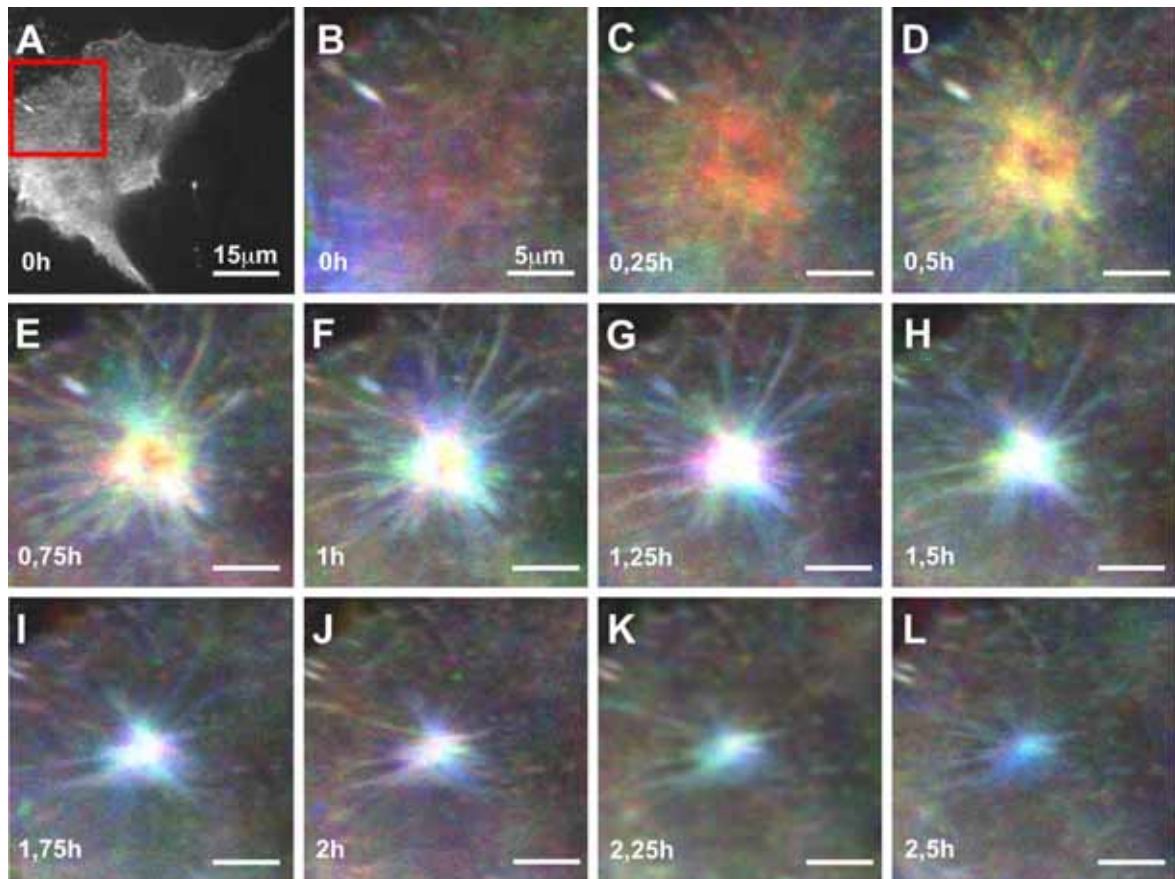


Abbildung 31: Zeitrafferstudie einer Aktinstern-Entstehung in Aktin-GFP-transfizierten L929-Zellen mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle im Überblick. Das rote Quadrat markiert den Bereich, in dem sich die Aktinwolke ausbildet. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die entstandene Aktinwolke kondensiert zu einem Stern (B-F). Vom Sternzentrum gehen in alle Richtungen Aktinfasern aus (E, F). Der beobachtete Stern wird anschließend wieder kleiner und verschwindet (G-L).

Eine der beobachteten Aktinwolken wurde innerhalb von 1 Stunde zu einem Aktinstern umgebildet, der anschließend wieder verschwand. Abbildung 31 A zeigt die gesamte Zelle zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Der rot markierte Bereich ist vergrößert dargestellt. Im Zentrum dieser Region entstand eine wolkenförmige, diffuse Aktinakkumulation. Auf Grund der Farbkodierung erscheint dieser Bereich rot (Abbildung 31 B). In der unteren linken Ecke erkennt man eine bläuliche Färbung, die anzeigt, dass die Umgebung der Aktinwolke an Aktin verarmt ist. 15 Minuten später hatte sich aus der Wolke ein Ring gebildet (B), der sich anschließend zusammenzog. Dabei erkennt man einen Farbwechsel von rot über gelb nach weiß (C-E). Dieser Farbwechsel bedeutet, dass die detektierte Signalintensität an dieser Stelle ab dem Zeitpunkt  $t = 0,5$  Stunden (D) konstant geblieben ist. Während der Umfang des Ringes kleiner wird, erscheint das Zentrum jeweils rot als Hinweis darauf, dass das Aktinsignal in der Mitte der Ringstruktur zu diesem Zeitpunkt neu detektiert wurde (D, E). Nach einer halben Stunde sind die ersten Aktinfasern gebildet worden (D), die sternförmig die Akkumulation umgeben. Der Ring kondensierte und bildete das Zentrum des Sterns (Abbildung 31 F). Stern und Fasern erscheinen im Folgenden weiß, anschließend wieder kleiner und verschwindet (G-L).



da sie länger als 30 Minuten mit konstanter Intensität detektiert wurden (E-F). Obwohl das Sternzentrum sehr symmetrisch erscheint, variieren die Fasern in Anzahl und Länge. Vom ersten Auftreten an werden die Fasern innerhalb von 30 Minuten immer deutlicher sichtbar (D-F). Die dabei erkennbaren blauen Schatten entlang der Fasern deuten auf eine Verarmung der Umgebung an Aktin hin.

In den folgenden 90 Minuten verschwand der Stern wieder (F-L). Die Anzahl der Fasern nahm dabei ab und das Zentrum verlor an Intensität. Die gesamte Struktur verkleinerte sich im Durchmesser von 4,1 Mikrometern auf 1,6 Mikrometer. Auf Grund der Farbkodierung erscheint dieser Prozess in blau. Nach 2,5 Stunden war der Stern vollständig verschwunden, die Struktur ist bis auf einen weißen Punkt in der Mitte nur noch in blau zu erkennen (L).

Die Bildung eines Aktinsterns aus einer Aktinwolke ist ein außergewöhnlicher Vorgang, der einer genaueren Untersuchung bedarf. So fiel auf, dass nicht alle Aktinwolken automatisch zu Sternen umgesetzt werden. Vielmehr wurden auch Aktinwolken beobachtet, die auftauchten, sofort wieder verschwanden und in einem Nachbarareal wieder akkumuliert wurden. Abbildung 32 zeigt eine solche Wolke und die Entstehung eines Aktinsterns im Nachbarareal. Anschließend wurde die Intensitätsverteilung über den Kondensationsprozess analysiert.

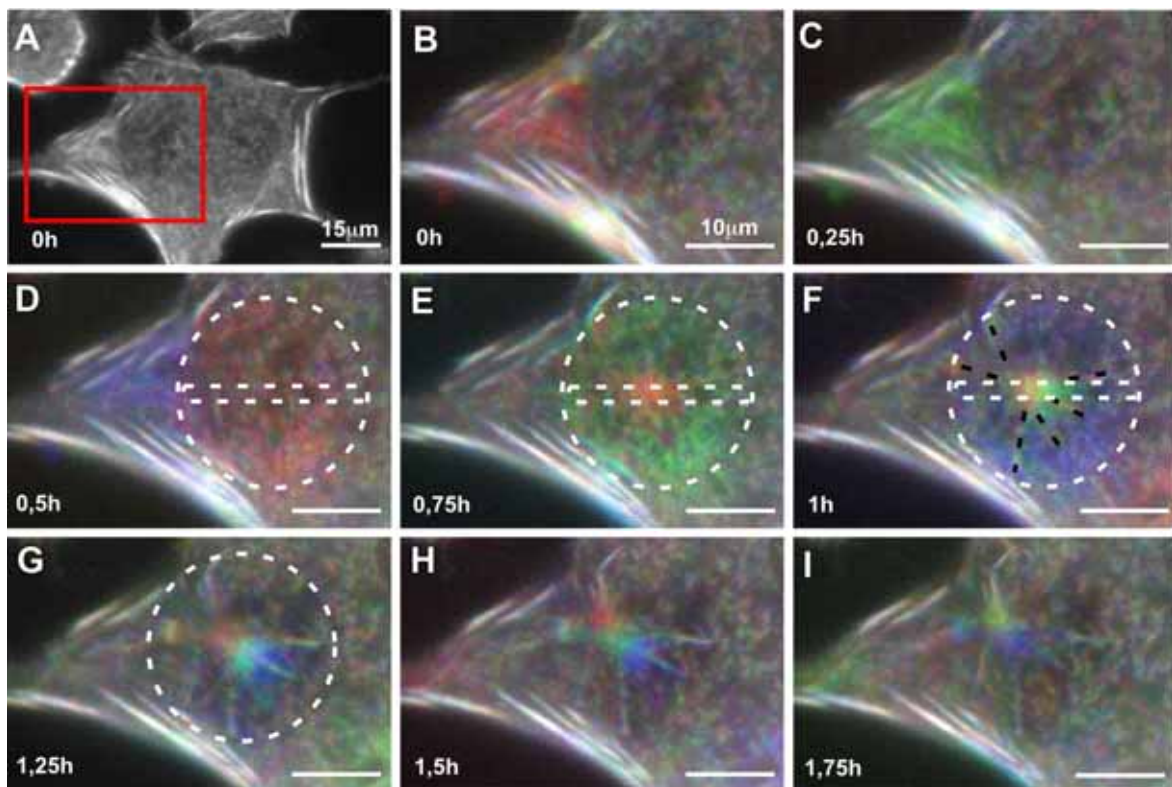


Abbildung 32: Zeitrafferstudie einer Aktin-GFP-transfizierten L929-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle im Überblick. Das rote Rechteck markiert den interessanten Bereich, der vergrößert dargestellt wird. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Eine Wolke entsteht im Randbereich der Zelle und verschwindet wieder (B-D). Im Nachbarareal

entsteht eine zweite Wolke (D, rot), die sich zusammenzieht und zu einem Stern mit 6 Fasern kondensiert (D-F). Die Länge der Fasern entspricht den Ausmaßen der ursprünglichen Wolke (F, weiße Kreise, gestrichelte Strahlen). Der fertige Stern wandert diagonal nach links oben (G-I Farbverlauf des Sternzentrums; D, G Versatz des Kreises). Die Fluoreszenzintensität wurde während des Prozesses in drei aufeinander folgenden Grauwertbildern gemessen (D-F, weiße Boxen).

Abbildung 32 zeigt eine Zelle, in der zweimal hintereinander eine Aktinwolke entstanden ist, wobei nur die zweite Wolke zu einem Stern kondensiert wurde. Im linken Teil der Zelle bildete sich in den Grenzen der Zellmembran eine dreieckige Aktinwolke (Abbildung 32 B, rot). An Hand der Farbkodierung kann man erkennen, dass diese Wolke eine Lebensdauer von unter 15 Minuten hatte. Bereits zum nächsten Zeitpunkt hatte sich die Akkumulation wieder aufgelöst (C, grün; D, blau). Im benachbarten Areal der Zelle entstand dann eine zweite Wolke (D, rot), die in ihrer Ausdehnung nicht begrenzt war und kreisrund erscheint (D, weißer Kreis). Im Zentrum dieser Wolke stieg die Aktinkonzentration an, wobei die Umgebung an Aktin verarmte. Die Farbe der Ursprungswolke wechselt dabei von rot direkt über grün zu blau (D-F). Im Zentrum hingegen ist ein entgegengesetzter Farbverlauf zu beobachten. Das Zentrum wird erst heller und behält dann die Intensität bei. Daraus ergibt sich ein Farbwechsel von rot über orange und gelb nach weiß (D-G). Um den Farbverlauf besser interpretieren zu können, wurde die Aktinkonzentration als Funktion der Signalintensität über die Gesamtbreite der Aktinwolke in den Grauwertbildern mittels ImageJ vermessen (D-F, weiße Boxen) und aufgetragen. In Diagramm 1 ist das Ergebnis dieser Untersuchung aufgetragen.

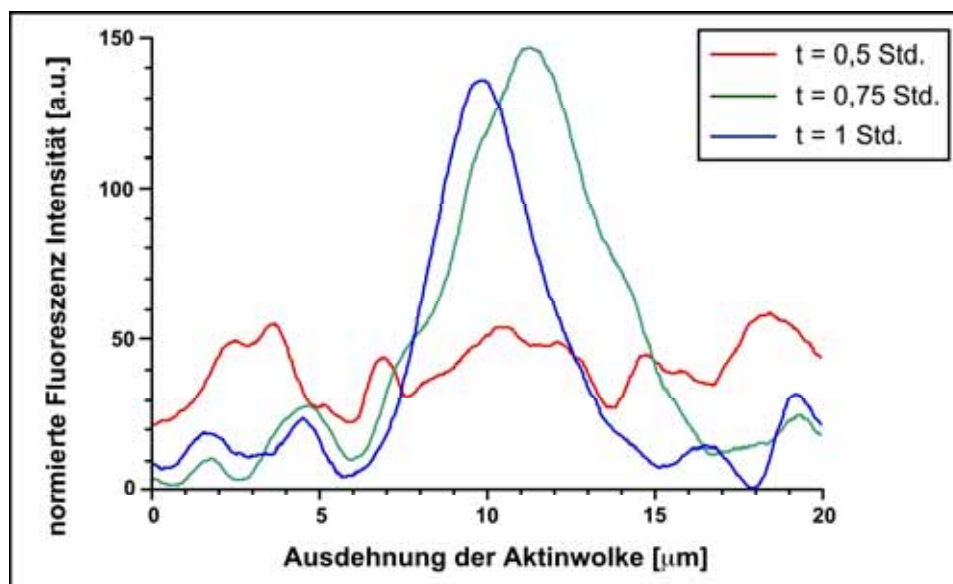


Diagramm 1: Verteilung der Aktinkonzentration als Funktion der Fluoreszenzintensität während der Kondensation (Abbildung 32, C-E weiße Boxen). Die Intensität im Zentrum der Wolke steigt auf das 3-fache an.

Das Aktin war in der diffusen Wolke (Abbildung 32 D, rot) gleichmäßig verteilt. Die Intensität schwankte um einen Mittelwert von ungefähr 40 Einheiten (Diagramm 1, rote Kurve). 15 Minuten später zeigt die Aktinverteilung einen zentralen Peak mit einem

Maximum bei 145 Einheiten. Im Gegenzug ist die Intensität in den Randbereichen auf ungefähr 15 Einheiten abgesunken (Diagramm 1, grüne Kurve). Der Intensitätsanstieg ist nicht auf neu detektiertes Aktin zurückzuführen, sondern die Verteilung ist inhomogen geworden, die Aktinkonzentration wurde im Zentrum der Wolke angereichert (Abbildung 32, E). Diese Anreicherung blieb über die nächsten 15 Minuten erhalten, was auch in der dritten Verteilungskurve zu erkennen ist (Diagramm 1, blaue Kurve). Flächenmäßig ist dieser Peak allerdings etwas kleiner. Das kann darauf zurückgeführt werden kann, dass ein Teil des Aktins zur Ausbildung der Fasern verbraucht wurde (Abbildung 32, F schwarze Linien). Das Intensitätsmaximum ist bei  $t = 1$  Stunde etwas nach links verschoben, was sich auch bereits im farbkodierten Bild erkennen lässt (Abbildung 32 F). Diese Dezentralisierung ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass der Aktinstern sich im weiteren Verlauf der Beobachtung auf die Zellmembran zu bewegt.

Die Aktinkonzentration im Zentrum der Wolke ist während der Bildung des Sterns deutlich angestiegen, (Diagramm 1, grüne Kurve). Die gelb-weiße Färbung in den farbkodierten Bildern (Abbildung 32, F) zeigt, dass sich die gemessene Aktinsignalintensität dort anschließend nicht mehr veränderte (s. Diagramm 1, blaue Kurve). Das detektierte Aktin bildete das Zentrum des entstehenden Aktinsterns. Vom Zentrum aus bildeten sich im Bereich der vorherigen Wolke sechs Fasern aus (Abbildung 32, F schwarze Striche). 15 Minuten später war der Stern vollständig ausgebildet und die Fasern gut zu erkennen (G). Die Umgebung der Fasern ist bläulich gefärbt, was auf eine Verarmung an Aktin hindeutet, und möglicherweise durch die Bildung der Fasern verursacht wird.

Das Sternzentrum sollte sich jetzt weiß darstellen, da sich an der Aktinverteilung innerhalb der letzten 30 Minuten nichts mehr verändert hat. Die tatsächliche rote Färbung (Abbildung 32 G, H) beruht jedoch auf der Wanderung des Sternzentrums diagonal nach links oben in Richtung der Zellmembran (D, G; Versatz des Kreises). Entlang der Wanderungsstrecke ergibt sich daher für das Sternzentrum ein Farbverlauf von rot über gelb-weiß nach grün zu türkis blau. Die beiden oberen Fasern wurden während dieser Verschiebung verkürzt, wobei die unteren verlängert wurden. Die Aktinfasern überspannen den Bereich, der von der ursprünglichen Wolke begrenzt wurde (D, G weißer Kreis). Dabei ist das Sternzentrum nicht immer symmetrisch positioniert, bzw. seine Position kann sich verändern (F-H). Zum Ende der Beobachtung verschwand der Stern wieder (I). Dabei wurde die Struktur in ihrer Intensität schwächer und erscheint grün-blau.

### 5.6.2 Dynamik von Aktinsternen

Aus Abbildung 32 ist neben der Kondensation einer Wolke zu einem Aktinstern abzulesen, dass es sich bei Aktinsternen um dynamische Strukturen handelt. Diese Beobachtung ist eine weitere Untersuchung wert. Abbildung 33 stellt einen weiteren Aspekt dieser Dynamik dar. Zwei Aktinsterne wandern aufeinander zu und fusionieren.

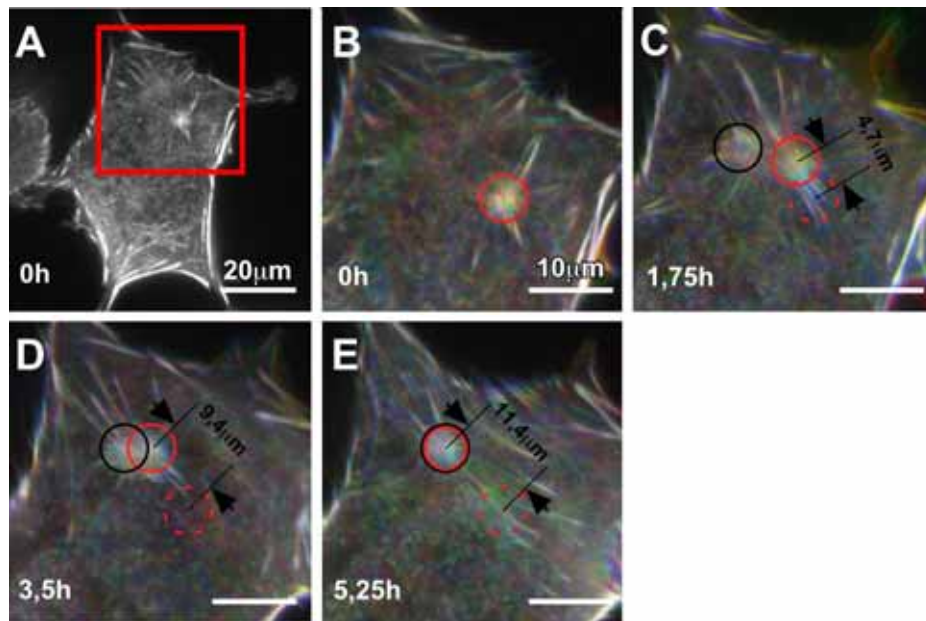


Abbildung 33: Zeitrafferstudie der Dynamik von Aktinsternen in Aktin-GFP-transfizierten L929-Zellen mittels TIRF-Mikroskopie. Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Ein Aktinstern (A, rotes Quadrat) wandert durch die Zelle (B-E). Die Position des Sterns ist mit einem roten Kreis markiert (B). Diagonal links oben in der Zelle entsteht ein zweiter Stern (C, schwarzer Kreis). Der erste Stern wandert auf den zweiten Stern zu und fusioniert mit diesem (E). Die gestrichelten Kreise markieren die Ursprungsposition des ersten Sterns (C-E). Der neue Stern ist nicht größer als die beiden Vorläufer (E). Vom Ursprungsort des ersten Sterns aus, haben sich entlang der Wegstrecke des Sterns durch die Zelle Aktinfasern angeordnet (E).

Abbildung 33 A zeigt eine Zelle mit einem ausgebildeten Aktinstern, der vergrößert dargestellt wurde (Abbildung 33 A, rotes Quadrat). Der beobachtete Stern war seit mehr als 30 Minuten stabil und erscheint daher gemäß der Farbkodierung in weißer Einfärbung. Der Stern besteht aus einem Zentrum mit verschiedenen langen Fasern, wobei diese asymmetrisch um das Zentrum verteilt sind. Die Position des Zentrums ist durch einen roten Kreis markiert (B). Diagonal nach links oben bildete sich im Verlauf der Beobachtung ein zweiter Stern aus (C, schwarzer Kreis), der über den gesamten Beobachtungszeitraum in Position, Größe und Form unverändert blieb (C-E). Der erste Stern wanderte auf den zweiten Stern zu und fusionierte mit diesem (C-E).

Der beobachtete Prozess verlief sehr langsam. Der Beobachtungszeitraum betrug 5,25 Stunden (Abbildung 33 B-E). Während der Wanderung des ersten Sterns wurden die Fasern umorganisiert und ihre Anzahl erhöhte sich. Die Fasern sind nun bipolar entlang der Bewegungsrichtung angeordnet. Die Ursprungsposition des ersten Sterns ist rot markiert (C-E, gestrichelter Kreis). Die zurückgelegte Strecke betrug in den ersten 1,75 Stunden 4,7 Mikrometer. In derselben Zeit legte der Stern anschließend dieselbe Entfernung noch einmal zurück. Die beiden Sternzentren befanden sich danach auf einer Höhe und die Sterne waren direkt nebeneinander lokalisiert (D). Dann folgte die Fusion des ersten mit dem zweiten Stern. Dabei entstand ein neuer Aktinstern, der in Größe und Form seinen Vorläufern glich. Der Gesamtgehalt an Aktin eines Sterns konnte nicht aus



den Bildern ermittelt werden, so dass dieser Eindruck nicht überprüft werden konnte. Das Zentrum des neuen Sterns ist mit der Position des zweiten Sterns identisch. Insgesamt legte der wandernde Stern eine Strecke von 11,4 Mikrometern zurück (E). Mehrere parallele Aktinfasern zeichnten die Wegstrecke nach.

### 5.6.3 Aktinakkumulationen bei C2C12-Zellen

In Analogie zu den Wolken und Sternen in den L929-Fibroblasten wurde in C2C12-Muskelzellen nach ähnlichen Strukturen gesucht. Auch bei diesen Zellen konnten wolkenförmige Aktinakkumulationen gefunden werden (Abbildung 34).

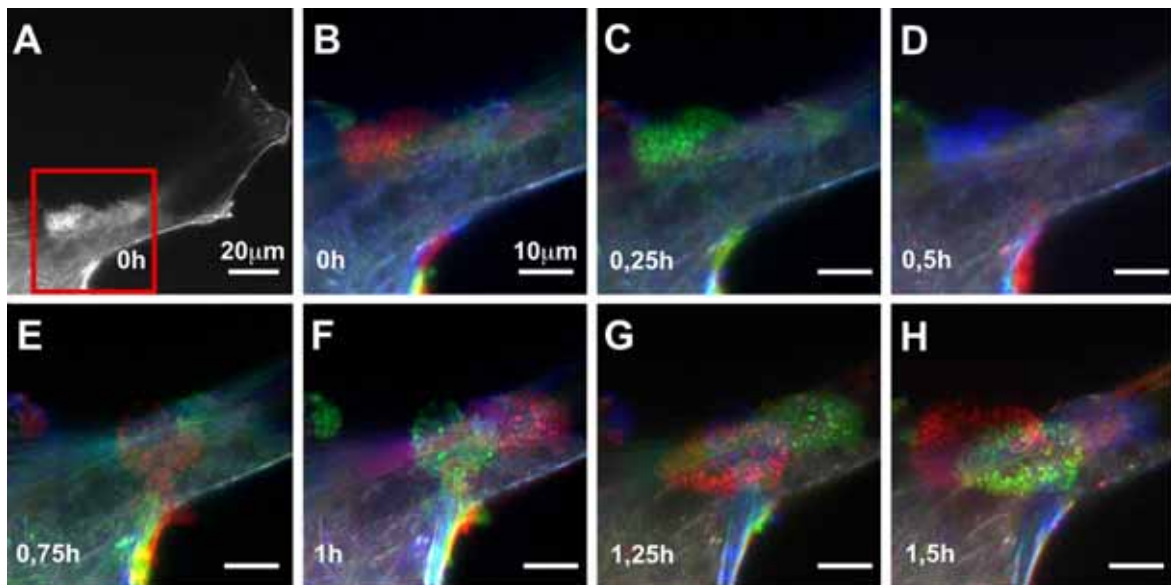


Abbildung 34: Zeitrafferstudie einer Aktin-GFP-transfizierten C2C12-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle in der Übersicht. Das rote Quadrat markiert den vergrößerten Bereich, in dem mehrmals hinter einander Aktinwolken entstehen (B-H). Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Das Erscheinungsbild der Wolken ist granulär.

In C2C12-Muskelzellen entstehen die Wolken in den Randbereichen der Zelle. Die gesamte Zelle erscheint leicht farbig, was darauf hindeutet, dass die Hintergrundintensität der Zelle schwankt. Trotzdem erkennt man eine wolkenförmige Aktinakkumulation von ovaler Form an der oberen Zellgrenze (Abbildung 34 B, rote Wolke). Im Gegensatz zu Aktinwolken in L929-Zellen (Abbildung 32) ist die Intensität nicht homogen verteilt, sondern das Aktin erscheint granuliert (Abbildung 34, B, F-H). Die Wolke hatte eine Lebensdauer von unter 15 Minuten und verschwand kurz nachdem sie aufgetaucht war wieder. Daraus ergibt sich der bekannte Farbverlauf von rot über grün nach blau (B-D). In den nächsten 1,5 Stunden konnte man alle 15 Minuten in benachbarten Arealen die Bildung einer neuen Aktinwolke beobachten (E-H, rote Wolken). Alle Wolken verschwanden gleich wieder und hatten keinen sichtbaren Effekt auf die Zelle. Wolken mit längerer Lebensdauer konnten nicht beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Wolkenform fällt ein weiterer Unterschied auf. In L929-Zellen waren die Wolken rund wenn sie nicht von der Zellmembran begrenzt wurden (Abbildung 32). In C2C12-Zellen hingegen haben die Wolken in benachbarten Arealen unterschiedliche Formen. Es wurden ovale Wolken beobachtet, auch wenn keine sichtbare Struktur die Ausdehnung begrenzt hat (Abbildung 34 F). Alle beobachteten Wolken zeigten granuliertes Aktin, das an sich homogen verteilt war. Indessen konnten Abweichungen zu dieser Verteilung beobachtet werden. Nach 1,25 Stunden Beobachtungszeit bildete sich eine Wolke, die keine homogene Aktinverteilung mehr aufwies. Bei dieser Wolke zeigte das Zentrum der Wolke keine Signalintensität (G), entspricht also eher einer ringförmigen Aktinakkumulation, denn einer Wolke. In weiteren Versuchen konnten diese ringförmigen Strukturen mehrfach beobachtet werden (Abbildung 35).

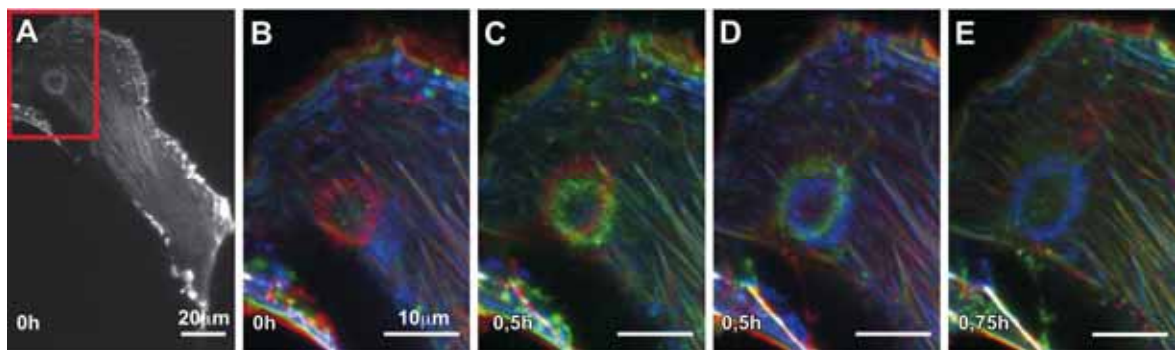


Abbildung 35: Zeitrafferstudie einer Aktin-GFP-transfizierten C2C12-Zelle mittels TIRF-Mikroskopie. A zeigt die Zelle in der Übersicht. Das rote Rechteck markiert den vergrößerten Bereich, in dem mehrfach hintereinander ringförmige Aktinakkumulationen entstehen (B-E). Die Einzelbilder ergeben sich aus der Farbkodierung (s. Abbildung 13). Die Lebensdauer der Ringe liegt unterhalb von 15 Minuten.

Die hier gezeigte Zelle akkumulierte Aktin nicht in Wolken, sondern in Form eines Rings. Der Ring bildete sich ebenfalls im Randbereich der Zelle und ist fast kreisrund (Abbildung 35 B). Die in Abbildung 34 beobachtete Granulierung der Wolken ist hier nicht so ausgeprägt, aber sichtbar. Der Aktinring hat eine Lebensdauer von unter 15 Minuten und zeigt daher den bekannten Farbverlauf von rot über grün nach blau (Abbildung 35 B-D). Direkt im Anschluss (C) bildete sich wieder ein Ring. Der zweite Ring ist genauso groß wie der erste, ist aber leicht nach oben verschoben (C, D). Auch dieser Ring verschwand direkt wieder und erscheint daher in rot, grün und blau (C-E). Da die beiden Ringe am selben Ort entstanden sind, hat man den Eindruck ein einziger Ring würde pulsieren.

Im Unterschied zu den L929-Fibroblasten bei denen sich aus Aktinwolken langlebige Aktinsterne bildeten, konnten bei C2C12-Zellen in keinem Experiment Aktinakkumulationen beobachtet werden, die eine größere Lebensdauer als 15 Minuten hatten oder zu Fasern umgebaut wurden.

## 6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Entstehung von Zellspuren detailliert untersucht. Dabei konnte deren Abhängigkeit von verschiedenen zellbiologischen Größen gezeigt werden. Es wurde der Zusammenhang zwischen Zellspurbildung und Adhäsion demonstriert, während gleichzeitig die Adhäsionsmuster auf dem Kultursubstrat mit der migratorischen Aktivität korrelierten. Diese Untersuchungen waren möglich, nachdem die technischen Anforderungen an den einzurichtenden Arbeitsplatz mittels eines Mikroskop-Aufbaus erfüllt waren, welcher die mehrtägige Beobachtung migrierender Zellen im evaneszenten Feld (TIRF) erlaubte.

### 6.1 Aufbau des TIRF-Zeitraffer-Arbeitsplatzes

Unter den möglichen Mikroskopie-Techniken, welche die Darstellung von Zell-Substrat-Wechselwirkungen optimal möglich machen, wurde in dieser Arbeit die TIRF-Mikroskopie ausgewählt. Mittels TIRF-Mikroskopie wird ausschließlich der substratnahe Bereich der Zelle abgebildet. Auf Grund des exponentiell abfallenden Anregungsfeldes erhält man nur eine sehr geringe Eindringtiefe in das Präparat (ca. 100 nm). Dabei ist die Diskriminierung in z-Richtung bis zu zehnfach besser, als beispielsweise bei der Verwendung der CLS-Mikroskopie. Eine ähnlich gute Diskriminierung in z-Richtung wie die TIRF-Mikroskopie würde auch die Interferenz Reflexions (IR-) Mikroskopie bieten. Bei Verwendung dieser Mikroskopieform können allerdings spezifische Proteinmarkierungen nur mit hohem technischem Aufwand durchgeführt werden. Zudem war aus früheren Experimenten bekannt, dass bei der Verwendung der IRM Zellen in ihrem Migrationsverhalten beeinträchtigt wurden (Richter et al. 2000), so dass diese Methode für die vorliegenden Versuche nicht geeignet war. Die Verwendung eines evaneszenten Feldes zur Anregung von Fluoreszenzmarkern reduziert zusätzlich die Belastung der Zellen durch die Bestrahlung mit hochenergetischem Licht auf den Untersuchungsbereich, so dass die Beeinflussung der Zellen und damit mögliche Schädigungen durch die Messmethode möglichst gering sind.

Um auch Langzeitbeobachtungen von Zellen durchführen zu können und die Dynamik der Zelladhäsion und -migration sowie die Bildung von Zellspuren beobachten zu können, wurde der hier aufgebaute Mikroskopie-Arbeitsplatz mit einer Klimatisierungsvorrichtung ausgestattet. Lange TIRF-Zeitrafferstudien stellen an den mikroskopischen Aufbau und die Präparate hohe Ansprüche. Eine stabile Temperatur, CO<sub>2</sub>- und Feuchtigkeitsregulation sind die Grundvoraussetzungen für die Langzeitbeobachtung lebender Zellen. Da die bisher verfügbaren Systeme diese Bedingungen nur unzureichend erfüllten, war die Entwicklung des „Cell Incubator“ von Olympus nötig. Die Umgebungsbedingungen im „Cell Incubator“ konnten über einen Zeitraum von mehreren Tagen stabil gehalten werden und ermöglichten eine weitgehend physiologische Kultivierung der Zellen während der

mikroskopischen Beobachtung. Der Einsatz eines Filtersystems für die eingehende Luft gewährleistet zudem die Sterilität der Präparate während der Beobachtungszeit. In Zusammenarbeit mit der Firma Evotec Technologies GmbH wurde das Gerät im Rahmen dieser Arbeit getestet und optimiert.

Beim Einsatz von Fluoreszenzverfahren mussten zusätzlich die zytotoxischen Einflüsse der Beleuchtung und der Farbstoffe auf die Zellen minimiert werden, um die Beeinflussung der Zellen durch den Messprozess möglichst gering zu halten. Daher wurde die Gesamtbeleuchtungsintensität des TIRF-Feldes für Langzeitbeobachtungen minimiert, in dem ein automatisches Verschlussystem in den Aufbau integriert wurde, mit dem die Beleuchtungszeiten auf die reine Aufnahmezeit reduziert werden konnten.

Ein weiteres Problem stellte die Wahl des Farbstoffes zur Anfärbung der Zellen dar. Es ist zu erwarten, dass bei blau anregbaren Farbstoffen auf Grund der höheren Energie des Anregungslichtes größerer Stress auf die Zellen wirkt und nicht jede Zelle gleich robust ist. Im Gegenzug musste allerdings die Signalintensität ausreichend hoch sein, um bei Anregung mit einem evaneszenten Feld Signale zu erhalten. Für die Beobachtung von Adhäsionsmustern bot sich zuerst ein einfacher zytosolischer Farbstoff an. Bei der Fülle der verschiedenen Adhäsionskomplexe erhält man so einen Überblick über die substratnahen Bereiche der Zelle. Die kommerziell erhältlichen Farbstoffe Calcein und Dihydrocalcein ermöglichten für Einzelaufnahmen deutliche Bilder, eigneten sich aber nicht für Langzeitversuche, da die zytotoxischen Nebenprodukte der Esterasereaktion die Zelle auf Dauer zu schwer belasteten. Auch das grün anregbare Calcein Red Orange war z. B. für L929-Fibroblasten innerhalb kürzester Zeit tödlich.

Daher bot sich für Langzeitstudien die Transfektion mit einem DsRed-Vektor an. So wurde ein stabiles, zytosolisch vorliegendes Fluorophor erhalten, das grün anregbar ist und keine auffälligen Zellschäden verursacht. Ebenso erfolgreich war die Transfektion mit Plasmid-DNA für ein GFP-Aktin-Fusionsprotein. In diesem Falle stellte die Anregung mit dem höherenergetischen Licht für die Zellen kein Problem dar. Diese Tatsache könnte darauf zurückgeführt werden, dass bei der Verwendung von Fusionsproteinen als Fluorophor keine toxischen Nebenprodukte entstehen und nur das Anregungslicht die Zelle belastet. Bei der Verwendung von Farbstoffen hingegen addieren sich scheinbar die zytotoxischen Belastungen aus Farbstoff und Beleuchtung.

Alle verwendeten Zellen waren unter Zeitraffer-Bedingungen und TIRF-Feld Anregung in der Lage, sich zu teilen. Ebenso wurden keine Unterschiede im Differenzierungsverhalten der C2C12 Muskelzellen beobachtet. Ein Großteil der Zellen zeigte zudem ein unverändertes Migrationsverhalten. Diese Tatsache ist als Fortschritt zu werten, da bei bisherigen Untersuchungen mittels IR- (Richter et al. 2000) oder TIRF-Mikroskopie (Geggier und Fuhr 1999) keine Migration beobachtet werden konnte. Um die Belastung möglichst gering zu halten, wurden große Zeitabstände (vier Bilder pro Stunde) für die Bildaufnahme gewählt. Dabei nimmt man allerdings in Kauf, dass beispielsweise schnelle



Umbauprozesse im Zytoskelett nicht abgebildet werden können. Die Wahl des Beobachtungsintervalls stellt also einen Kompromiss dar, der aber die Beobachtung von Zellen im TIRF-Mikroskop über mehrere Tage möglich machte.

Hochauflösende Mikroskopie über längere Zeiträume erfordert eine sehr stabile Fokusslage. Im Zusammenhang mit einer Klimatisierung des experimentellen Aufbaus kommt es dabei durch die entstehenden Temperaturgradienten zu zusätzlichen Problemen. Auf Grund des Temperaturunterschieds zwischen der Inkubationskammer (37 °C) und der Raumluft (20-25 °C) bilden sich Temperaturgradienten aus. Dabei stellt der Gradient zu den Außenwänden nur im Bezug auf Kondenswasserbildung ein Problem dar, die leicht durch Reduzierung der Gesamtfeuchtigkeit auf 65-70 Prozent verhindert werden kann. Die geringere Feuchtigkeit gegenüber den herkömmlichen Zellkulturbedingungen stellt bei geschlossenen Reaktionsgefäßen kein Problem dar. Hingegen wirkt sich der Gradient, der sich entlang des Mikroskopstativs und damit auch entlang der Fokussiereinheit ausbildet, deutlich auf die Fokussstabilität aus. Zusätzlich unterliegen Mikroskoptisch und Objektiv unterschiedlichen klimatischen Bedingungen, da sie an verschiedenen Stellen Kontakt zum Mikroskopstativ haben.

Ein Software-Autofokussystem, bei dem in einem iterativen Prozess Bilder aufgenommen werden und die Software den Schärfegrad des Bildes erkennt, stellt für dieses Problem keine Lösung dar. Weder ist ein Bleichen der zu beobachtenden Stelle gewünscht, noch ist die zusätzliche Strahlungsbelastung für die Zellen zu tolerieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Spezialtisch eingesetzt, bei dem Objektiv und Mikroskoptisch mechanisch gekoppelt sind und somit den gleichen Schwankungen unterliegen. Eine zylindrische Halterung im Objektivrevolver nimmt das Objektiv auf. Der magnetisch fixierte Präparathalter ist relativ zum Objektiv fixiert und nicht weiter mit dem Mikroskopstativ verbunden. Die Fokussierung erfolgt rein mechanisch über ein Feingewinde. Ein bedeutender Nachteil dieses Systems ist, dass keine Automatisierung der x-y-Bewegung des Tisches möglich ist. In Zukunft wird sich das Fokusproblem mittels eines seit neuestem auf dem Markt erhältlichen Hardware-Autofokus lösen lassen. Dabei wird durch einen zusätzlichen Laserstrahl vor jeder Bildaufnahme die aktuelle Position der Präparatunterseite bestimmt und entsprechend nachfokussiert. Diese technische Neuerung ermöglicht es, den bisher rein mechanischen Mikroskopaufbau in Zukunft zu automatisieren. Dadurch wird es möglich sein, mit einer Routine zur sequentiellen Ansteuerung verschiedener x-y-Positionen in einem Experiment mehrere Zellen parallel zu untersuchen. Geht man nun beispielsweise von einer kurzen Belichtungszeit und Zeiten von 1-2 Sekunden für jeweils x-y-Weg und Fokussierung aus, kann man überschlagen, dass auf jeden Fall die Aufnahme von 10 Zellen pro Minute (also 150 Zellen im üblichen Beobachtungsintervall von 15 Minuten) möglich sein sollte. Durch diese Art der Bildaquisition wird eine genaue statistische Auswertung der Daten möglich gemacht, so dass die gewonnenen Erkenntnisse auf einem soliden Fundament stehen.

TIRF-Beleuchtung kann sowohl mittels eines Laserstrahls, als auch mittels einer Hg-Dampflampe realisiert werden. Die Lampenbeleuchtung hat den Vorteil, dass mehrere Wellenlängen zur Anregung von Fluorophoren zur Verfügung stehen. Als Nachteil ist das nichthomogene TIRF-Feld zu nennen, das auf Grund der Tatsache entsteht, dass es sich bei einer Lampe um eine ausgedehnte statt punktförmiger Lichtquelle handelt, die nicht kollineares Licht aussendet. Daher ist es nicht möglich, komplett parallele Strahlengänge zu erzeugen. Das mit der Hg-Dampflampe erzeugte evaneszente Feld war allerdings für die hier untersuchten Fragestellungen völlig ausreichend.

## **6.2 Datenauswertung**

Um die dynamischen Prozesse der Zelladhäsion und -migration sowie der Zellspurbildung auswerten zu können war es notwendig, eine Darstellungsform zu entwickeln, die die Dynamik in statischen Bildern sichtbar machen kann. Dabei sollte ein möglichst einfacher Algorithmus zur Anwendung kommen und wenn möglich auf Spezialsoftware verzichtet werden. Die in Abschnitt 4.2.4.3 beschriebene Farbkodierung erfüllt diese Anforderungen. Sie ermöglicht es Aufnahmen einer Zeitrafferstudie so in Farbbilder umzusetzen, dass die entstehenden Farben Auskunft über Auftreten und Stabilität des detektierten Fluoreszenzsignals geben. Mit dieser Übertragung eines zeitlichen Verlaufes in eine Farbinformation wird die Auswertung der Bilder vereinfacht, da nicht mehr Helligkeitsunterschiede ausgewertet werden müssen, sondern nur noch eine Farbinformation.

Mit Hilfe dieser Farbkodierung kann man dynamischen Prozessen eine Richtung zuordnen. Beispielsweise lässt sich die Migrationsrichtung einer Zelle an der Farbverteilung ablesen. Ebenso lassen sich Aussagen über die Langlebigkeit von Signalen und damit über die dahinter stehenden Strukturen, wie z. B. über das Aktinzytoskelett oder die Stabilität von Adhäsionsmustern, treffen. Diese Tatsache hat die Auswertung der dynamischen Aufnahmen bei der Entstehung von Zellspuren erleichtert und interessante Zusammenhänge zwischen Zellspurentstehung und Adhäsionsmustern aufgedeckt.

## **6.3 Untersuchung der Adhäsionsmuster und Migrationsformen**

Für die technische Nutzung von Zellspuren zur Analyse von Einzelzellen ist es bedeutend den Prozess der Zellspurablage zu verstehen und kontrollieren zu können. Die in diesem Zusammenhang wichtigen biologischen Prozesse sind die Zellmigration und die Zelladhäsion. In beiden Fällen spielt neben den zellspezifischen Eigenschaften die Wechselwirkung der Zelle mit der Substratoberfläche eine wichtige Rolle. Zur Analyse dieser Prozesse unter der Berücksichtigung der Frage nach Kontrolle der Migration, der Zellspurbildung oder auch der Zellspurmorphologie, wurde in der hier vorliegenden Arbeit dem dynamischen Verhalten unstimulierter Zellen in den Bereichen der Zelladhäsion und der Zellmigration besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Zum Vergleich der verschiedenen Verhaltensweisen waren vier Zelllinien gewählt worden, deren Zellspurbildung teilweise bereits früher beobachtet worden war (Fuhr et al. 1998). Untersucht wurden eine nichtmigrierende Epithelzelle (CHO), zwei migrierende Fibroblastenlinien (L929 und 3T3) und eine ebenfalls migrierende Muskelzelllinie (C2C12). Im Gegensatz zu 3T3-Zellen hinterlassen L929-Fibroblasten ausgeprägte Zellspuren (Fuhr et al. 1998). Über die Muskelzelllinie lagen bezüglich des Zellspurbildungsverhaltens noch keine Ergebnisse vor. Im Folgenden wurde das zellspezifische Adhäsionsmuster mit dem Migrationsverhalten der Zellen verglichen und so Gesetzmäßigkeiten für die Ablage von Zellspuren gefunden.

### 6.3.1 Unterscheidung der Adhäsionsmuster

Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsionsmuster der Zellen nicht rein zufällig angeordnet waren, sondern sich in zwei Grundformen, "punktförmig" und "riefenförmig", einteilen lassen.

Die zytosolischen Färbungen zeigten, dass das punktförmige Adhäsionsmuster bei L929-Fibroblasten in zwei Zuständen auftritt. Die nichtpolarisierten, runden Zellen zeigten gleichmäßig über die ventrale Membran verteilte Adhäsionspunkte, wohingegen bei polarisierten Zellen eine deutliche Zellfront zu erkennen war. Dieser Bereich war insgesamt heller und damit näher am Substrat lokalisiert als der Zellkörper und zeigte mehr Adhäsionspunkte. Die erhöhte Anzahl von Adhäsionsstellen kann mit einer stärkeren Adhäsion in Einklang gebracht werden (Hornung und Fuhr 1996; Hornung et al. 1996). Bei den anderen drei Zelllinien wurden lange parallele Riefen gefunden, die den kompletten Zellkörper durchspannten (Abbildung 11).

Die Strukturierung der ventralen Zellmembran wird durch das Zytoskelett der Zelle verursacht, wenn sich die dort vorhandenen Strukturen nach unten in die Membran abformen. Die Färbung mit Phalloidin zeigte, dass die langen parallelen Riefen, die im Adhäsionsmuster von C2C12-, 3T3- und CHO-Zellen zu beobachten waren, durch parallel verlaufende Aktinfasern verursacht wurden. Es ist bemerkenswert, dass auch das punktförmige Adhäsionsmuster der L929-Fibroblasten im Aktinbild wieder zu finden war. Da die Strukturen sich mit Phalloidin anfärben ließen, musste es sich ebenfalls um filamentöses Aktin handeln. Das führte zu der Überlegung, dass die Punktstruktur im evaneszenten Feld dadurch zustande kommen muss, dass durch die begrenzte Fluoreszenzanregung nur jeweils die Enden von Aktinfasern mit Ausdehnung in höher gelegene Teile der Zelle sichtbar sind. Der Vergleich mit einem Epifluoreszenzbild zeigte, dass die Aktinfasern in L929-Zellen in leichten Bögen angeordnet waren und die im TIRF-Feld zu erkennenden Punktmuster die Enden dieser Fasern darstellten. Dabei erstreckten sich die Fasern in der polarisierten Zelle von der zentralen sternförmigen Aktinanordnung bis nach hinten zum Zellausläufer. Im Vergleich dazu lag das Aktin bei den Zellen mit dem riefenförmigen Adhäsionsmuster parallel zum Substrat direkt über der ventralen Membran.

Um zu klären, ob sich diese Unterschiede auch Auswirkungen auf das Migrationsverhalten haben, wurde die Dynamik der Adhäsionsmuster im Zeitraffer untersucht. Abbildung 15 zeigt, wie sich das Adhäsionsmuster einer L929-Zelle veränderte, während sie eine Polarisationsrichtung aufbaute und zu migrieren begann. Dabei sind zwei Dinge besonders zu beachten. Zum einen blieben Adhäsionspunkte stabil erhalten und waren sowohl in der nichtpolarisierten Zelle als auch in der polarisierten Zelle zu erkennen. Diese Tatsache ist im Zusammenhang mit der Entstehung der Zellspuren interessant und wird später näher erläutert werden (s. Abschnitt 6.4.1). Zum anderen kann man erkennen, dass die Zelle mit dem Übergang zur Migrationsform die Adhäsionsfläche vergrößert hat. Es sind mehr Adhäsionspunkte zu erkennen und der gesamte Frontbereich ist näher am Substrat lokalisiert, erscheint also heller. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen während der Migration im vorderen Bereich mehr Kraft auf das Substrat übertragen müssen, als zur reinen Adhäsion benötigt wird (Beningo et al. 2001; Dembo und Wang 1999). Gleichzeitig wurden die Adhäsionsstrukturen im Bereich des Zellkörpers und des Zellausläufers reduziert.

Im Gegensatz dazu scheint der Prozess bei den beiden riefenbildenden Zellen kontinuierlich zu verlaufen. Bei der Protrusion der C2C12-Muskelzellen erkennt man, wie bestehende Adhäsionsriefen verlängert wurden und sich die Zelle gleichzeitig darüber wegschob (Abbildung 17). Dabei blieb das Muster im Bereich des Zellkörpers unverändert erhalten. Die Änderungen sind deutlich geringer als bei den L929-Zellen und bleiben nur auf den reinen Protrusionsbereich beschränkt. Dasselbe ist zu beobachten, nachdem die Zelle ihre Richtung geändert hatte und den vorher vorgeschobenen Bereich wieder zurückzog. Auch bei diesem Prozess bleibt das Grundmuster erhalten und die Adhäsionsriefen wurden kontinuierlich verkürzt. Die 3T3-Fibroblasten verhielten sich analog zu den C2C12-Zellen und behielten ihr Riefenmuster während der Migration ebenfalls bei.

### **6.3.2 Zusammenhang zwischen Adhäsionsmustern und Migrationsverhalten**

In der Literatur existieren zwei verschiedene Modelle, das Kontraktions- und das Transportmodell, die beschreiben, wie die Aktomyosin-Kontraktion in eine Bewegung der Zelle umgesetzt werden kann.

Das Kontraktionsmodell entspricht der ursprünglichen Beschreibung des Migrationszyklusses für Fibroblasten-ähnliche Zellen (Sheetz et al. 1998). Die Zellen kontrahieren symmetrisch und die Vorwärtsbewegung erfolgt durch eine starke Adhäsion an der Front und eine schwache Adhäsion am Zellende (Mitchison und Cramer 1996). Dieses Modell wäre eine Erklärung für die beobachtete Adhäsionsveränderung beim Übergang der L929-Fibroblasten von der nichtpolarisierten in die polarisierte Form. Die Zellen verstärkten die Adhäsion an der Front und verringerten die Adhäsion im Bereich des Zellkörpers bzw. des Zellausläufers. Die beobachteten Aktinfasern, die vom Zentrum der

Zelle bis nach hinten in den Zellausläufer gespannt waren, müssten dann dem Modell zufolge symmetrisch kontrahieren und die Kraft zur Vorwärtsbewegung der Zelle entwickeln. Eine Nettobewegung wird durch eine asymmetrische Verteilung der Adhäsionsstärke, wie in Abbildung 15 bei L929-Fibroblasten beobachtet, erreicht. Die geeignete molekulare Struktur für diese Kontraktion ist die Aktin-Stressfasern, deren Filamente eine alternierende Polarität besitzen (Small 1988).

Im Gegensatz dazu geht das Transportmodell davon aus, dass die Zelle direkt vom Myosin entlang der Aktinfasern nach vorne transportiert wird. Dafür müssen die Aktinfasern einheitlich orientiert sein, wie es z. B. in Herzfibroblasten beschrieben wurde, in denen die Orientierung der Fasern zur Front hin immer homogener wurde (Cramer 1997). Ein solches Modell kann mit dem Adhäsionsmuster der riefenbildenden C2C12-Zellen in Einklang gebracht werden. Das kontinuierliche Vorschieben und Verlängern der Riefen spricht für einen direkten kontinuierlichen Transport der Zellen über das substratnahe Aktin. Das Aktinzytoskelett dient beim Transportmodell als ortsfester Untergrund über den die Zelle transportiert wird. Die Beobachtung, dass das substratnahe Aktin in C2C12-Zellen parallel zum Substrat ausgerichtet ist und planar in der Zelle liegt, ist ebenfalls mit dieser Modelvorstellung vereinbar.

Auf Grund der Ähnlichkeiten im Adhäsionsmuster ist auch bei den 3T3-Fibroblasten die Zuordnung zum Transportmodell bezüglich der Migration zu erwarten. Dem widerspricht allerdings die Tatsache, dass bei Konkurrenzexperimenten mit RGD festgestellt wurde, dass der Verlust der Adhäsion am Zellende keine Auswirkung auf die Migration hat, aber beim Verlust der Adhäsion an der Zellfront die Zelle Ausbreitung und Polarisation verliert (Munevar et al. 2001b). Diese Experimente deuten auf eine asymmetrische Adhäsionsstärke hin, wie es beim Kontraktionsmechanismus zu finden ist. Allerdings wurden diese Experimente auf Kollagen I-beschichteten Polyacrylamidsubstraten durchgeführt. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hat die Beschaffenheit der Substratoberfläche großen Einfluss auf die Adhäsionsmuster (s. Abbildung 27) und eventuell auch auf den verwendeten Migrationsmechanismus. Zudem ist bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 3T3-Zellen keine klassische Migrationsmorphologie zu erkennen, so dass eine direkte Vergleichbarkeit mit den Konkurrenzexperimenten schwierig ist. Denkbar sind auch Mischformen zwischen den beiden Modellen. Aufschluss über die den Adhäsionsmustern zu Grunde liegenden Migrationsmechanismen könnte die Untersuchung der Aktinorientierung geben, die mit Hilfe der Ausrichtung der Myosinköpfe bestimmt werden könnte.

Der Vergleich der Adhäsionsmuster mit den RC-Zeitrafferaufnahmen zeigt einen Unterschied im Migrationsverhalten zwischen den beiden Zelltypen, die ein riefenförmiges Adhäsionsmuster zeigen, und den L929-Fibroblasten mit ihrem punktförmigen Adhäsionsmuster (Abbildung 10). L929-Fibroblasten wanderten individuell und vermieden jeglichen Kontakt zu benachbarten Zellen. Im Einzelfall führte das dazu, dass die Zellen sich auswichen, wenn sie aufeinander trafen und nach einer Zellteilung in entgegen

gesetzte Richtungen liefen. Dieses Verhalten blieb bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz erhalten. Im Gegensatz dazu bildeten C2C12- und 3T3-Zellen relativ zügig kleine Gruppen und hielten den Kontakt zu Nachbarzellen aufrecht. Im Zusammenhang mit der Migration führte das dazu, dass sich Zellen parallel bewegten, oder Spannungen auftraten, wenn die Zellen einer Gruppe in unterschiedliche Richtungen migrierten. Man hat den Eindruck, dass es sich um eine schiebende / ziehende und kontinuierliche Bewegungsform handelt wobei die Zellen sehr stark ausgebreitet und damit recht flach waren. Im Gegensatz dazu schienen die L929-Fibroblasten sich ruckartiger vorwärts zu bewegen und nicht so flach auf dem Substrat ausgebreitet zu sein.

Die Zuordnung der unterschiedlichen Migrationsverhalten zu einem der beiden Translokationsmodellen ist hier spekulativ. Zellen mit riefenförmigem Adhäsionsmuster weisen auch bzgl. ihres Migrationsverhaltens Gemeinsamkeiten auf (tendieren zur Bildung von Zellverbänden), wohingegen die L929-Fibroblasten mit ihrem punktförmigen Adhäsionsmuster auch bei der Migration eine Sonderrolle einnahmen.

## **6.4 Entstehung von Zellspuren**

Bei der Betrachtung der Adhäsionsmusterdynamik der L929-Fibroblasten fiel auf, dass vereinzelte Punkte aus dem Muster der nichtpolarisierten Zelle auch in der polarisierten Form erhalten blieben. Diese Punkte befanden sich im Bereich des Zellkörpers bzw. des Zellausläufers. Die Tatsache, dass Adhäsionspunkte in nichtmigrierenden L929-Fibroblasten über einen langen Zeitraum stabil bleiben können, ist bereits beobachtet worden (Geggier und Fuhr 1999). Interessant war hier die Feststellung, dass ein Teil der Adhäsionen auch erhalten blieb, wenn die Zelle polarisiert wurde und zu migrieren begann. Dabei könnte es sich um Adhäsionspunkte handeln, die von der Zelle nicht mehr gelöst werden können und daher auf der Oberfläche zurückbleiben (Bard und Hay 1975; Chen 1981a; Chen 1981b). Es konnte gezeigt werden, dass diese stabilen Adhäsionspunkte für die Entstehung von Zellspuren von besonderer Bedeutung sind.

### **6.4.1 Entstehung der Verzweigungen in L929-Zellen**

Es zeigte sich, dass Adhäsionspunkte in L929-Fibroblasten, die eine Zeit ortsfest auf dem Substrat adhärten, als Startpunkte der Zellspuren zurückblieben und während der Zellspurbildung kaum verändert wurden (Abbildung 20 und Abbildung 22).

Dabei bestimmte das Muster der stabilen Adhäsionspunkte die Morphologie der Zellspur. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Adhäsionspunkten bildeten die Linienelemente der Zellspur, die Adhäsionspunkte die Verzweigungen. In diesem Zusammenhang ist auch die bei der ursprünglichen Beschreibung der Zellspuren gefundene Beobachtung zu erklären, dass der Bereich zu Beginn der Spur immer den größten Verzweigungsgrad aufweist (Fuhr et al. 1998).

Bevor Zellen anfangen zu migrieren, müssen sie für eine gewisse Zeit auf einer Stelle adhärirt haben. In dieser Zeit sind mehr oder weniger viele stabile Adhäsionen entstanden, die von der Zelle nicht mehr gelöst werden. Ein größerer Anteil an stabilen Adhäsionen müsste somit, zu einem höheren Verzweigungsgrad der Zellspur führen. Während der Migration ist die Anzahl der festen Adhäsionen geringer, so dass der Verzweigungsgrad der Zellspur kleiner wird. Der von Richter et al. (2000) gefundene Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der migrierenden Zelle und dem Verzweigungsgrad der Spur lässt sich mit der hier gemachten Beobachtung erklären.

Die in Abbildung 22 entstandene Zellspur entspricht genau diesen Prinzipien. Im Adhäsionsmuster der Zelle ist in der oberen Ecke ein kleiner Bereich zu sehen, in dem keine Adhäsionspunkte zu erkennen sind (B, weißer Pfeil). In diesem Teil ist später bei der Zellspur auch keine Verzweigung zu sehen. Diese Stelle wird nur von Linienelementen überbrückt. Ansonsten lassen sich die Adhäsionspunkte als Verzweigungspunkte in der fertigen Spur wiederfinden.

Interessanterweise sind, nachdem die Zelle ihre ursprüngliche Adhäsionsposition verlassen hat, zunächst nur die Verzweigungspunkte zu erkennen. Die verbindenden Linienelemente sind erst ungefähr eine Stunde später zu sehen und nehmen dann kontinuierlich an Intensität zu. Bei dieser Beobachtung handelt es sich nicht um ein Artefakt, welches beispielsweise durch eine Zunahme der Beleuchtungsintensität der Lampe verursacht wird. In diesem Falle müsste die lokale Signaländerung in allen Bereichen der Zellspur homogen sein. Das ist hier nicht der Fall, so dass die Intensitätszunahme auf einen anderen Effekt zurückgeführt werden muss (Abbildung 23). Möglich wäre eine Änderung des Farbstoffgehalts in den Spuren oder eine Zunahme der Fluoreszenz des vorhandenen Farbstoffs. In diesem Experiment handelte es sich um DsRed-transfizierte Zellen. Daher kann eine Zunahme an Fluorophoren ausgeschlossen werden, sobald der Zellkörper und damit die Proteinsynthesemaschinerie außerhalb des Diffusionsbereichs lokalisiert oder von der Zellspur getrennt sind. Eine Zunahme der Quantenausbeute ist ebenso nicht möglich. Ein kontinuierliches Absinken der Spuren in das TIRF-Anregungsfeld stellt somit die wahrscheinlichste Lösung für die Intensitätszunahme dar. Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Form mit IR-Mikroskopie bereits früher gemacht (Richter et al. 2000). Als Erklärung wurde von den Autoren ebenfalls vorgeschlagen, dass die Spuren sich zuerst noch außerhalb des anregbaren Bereiches befanden und anschließend absanken.

Bei der quantitativen Auswertung wurde festgestellt, dass nicht nur die Spuren, sondern auch die Adhäsionspunkte an Intensität zunehmen, also in Richtung des Substrats absinken. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass auch der Abstand von Fokalen Adhäsionen (FA) zum Substrat noch 10-20 Nanometer beträgt (Zamir et al. 2000). Würde die Struktur, die diesen Abstand stabilisiert, kollabieren, müssten die FA näher an die Oberfläche gelangen und im TIRF-Feld heller fluoreszieren. Interessant ist, dass der Effekt bei den Linienelementen signifikant größer ist, so dass diese Tatsache hier

ausführlicher diskutiert werden muss. Um ein solches Absinken zu ermöglichen, könnte die Zellspur vorher in einer Art Bogen vorgelegen haben, der dann an Spannung verliert und kollabiert.

Die Lage des Aktinzytoskeletts in L929- Zellen lässt ein solches Szenario zu. Abbildung 12 zeigt, dass die Stressfasern, die das Zellzentrum mit dem Zellende verbinden, normalerweise in Bögen und damit außerhalb des TIRF-Feldes liegen. Bei der Erstbeschreibung der Zellspuren wurde je nach Alter der Spuren F-Aktin oder G-Aktin nachgewiesen (Fuhr et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich die Entstehung einer Zellspur von einer GFP-Aktin transfizierten C2C12-Zelle beobachtet werden (Abbildung 26). Dabei wurde zwischen zytosolischer Färbung und dem Aktinbild kein Unterschied festgestellt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auch die Zellspuren der anderen Zelllinien Aktin enthalten und die Bilder den mit zytosolischer Färbung aufgenommenen entsprechen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Linienelemente von Zellspuren zwischen zwei Verzweigungspunkten mittels einer AFM-Spitze verschoben werden können (Westphal et al. 2004). Es wäre also möglich, dass Zellspuren von L929-Zellen auf Grund der Lage des Aktinzytoskeletts in kleinen Bögen angeordnet sind.

Zu klären ist, warum diese Bögen nach einer gewissen Zeitspanne absinken. Dabei sind folgende Punkte zu bedenken. Die Linienelemente tauchen alle gemeinsam im TIRF-Feld auf, unabhängig von ihrer räumlichen Entfernung zueinander oder ihrem Abstand zur Zelle. Würde dieses Absinken mit dem Alterungsprozess der Spuren in Zusammenhang stehen, wie z. B. bei einem Zusammenbruch des F-Aktinskeletts, sollte dieser Prozess einer zeitlichen Chronologie gehorchen. Das ist allerdings nicht der Fall, da hier die linke Seite des Adhäsionsmusters früher von der Zelle verlassen wird als die rechte (Abbildung 22, E, F). Zudem ist das F-Aktin in der C2C12-Spur deutlich länger stabil (Abbildung 26), als die Spur der L929-Zellen für das Absinken benötigt. Eine Trennung des F-Aktins von der Fokalen Adhäsion (FA) kommt ebenfalls nicht in Frage, da auch für dieses Szenario gilt, dass es bei älteren Bereichen eher einsetzen müsste. Ein aktiver Prozess ist ebenso unwahrscheinlich, da es sich bei der gesamten Zellspurentstehung offenbar um einen passiven Prozess handelt. Um diese Frage abschließend zu beantworten, müsste eine parallele Zeitrafferaufnahme mit TIRF- und Epifluoreszenzbeleuchtung von einer Zellspurentstehung durchgeführt werden. Die dafür nötigen technischen Voraussetzungen waren allerdings in der vorliegenden Arbeit nicht gegeben.

### **6.4.2 Entstehung der parallelen Zellspuren in C2C12-und 3T3-Zellen**

Zellspuren, die aus dem punktförmigen Adhäsionsmuster der L929-Fibroblasten entstanden, sind reich verzweigt. Ganz anders stellte sich die Morphologie der Zellspuren von den beiden Zelllinien dar, die ein riefenförmiges Adhäsionsmuster aufwiesen. Zellspuren von C2C12-Muskelzellen und 3T3-Fibroblasten bestehen aus mehreren



parallelen, unverzweigten einzelnen Linienelementen (Abbildung 21). Überträgt man nun den Mechanismus der Zellspurentstehung von L929-Fibroblasten so erwartet man, dass die Zellspuren bei C2C12- und 3T3-Zellen aus den Riefen entstehen. Das konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

Man könnte sich die Entstehung der Zellspuren von C2C12- und 3T3-Zellen wie folgt vorstellen. Wenn die Zellmembran von den Zellen zurückgezogen wird und die FA an den Enden der Riefen nicht gelöst werden, bildet sich um die Aktinfilamente herum ein Membranschlauch. Dieser wird immer weiter ausgezogen und irgendwann von der Zelle getrennt. Dabei muss die Zellmembran noch eine gewisse Zeitspanne intakt sein, da die Zellspuren mit Calcein gefärbt werden können (s. Abbildung 21, Abschnitt 4.2.3.1).

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der Zellspurentstehung eine Korrelation zwischen der Morphologie der Zellspur, der Zelladhäsion, und dem Zellskelett, das ja der hauptsächliche Akteur bei der Migration ist, besteht. Am Beispiel der C2C12-Zelle aus Abbildung 26 erkennt man deutlich, wie die parallel ausgerichtete, wenig verzweigte Zellspur direkt aus den parallel angeordneten Aktinfasern des Zellskeletts hervorgeht, deren Anordnung auch in den riefenförmigen Adhäsionsmuster wieder zu finden ist (Abbildung 11).

### **6.5 Modifikation der Substratoberfläche**

In einem Organismus ist die unmittelbare Umgebung der meisten Zellen nicht homogen sondern auf hochkomplexe Weise strukturiert (Abrams et al. 2000; Wezemann 1998). Diese Umgebung zusammen mit löslichen Faktoren bestimmt die vollständige Entwicklungsgeschichte der Zelle. Es liegt nahe, diese Tatsache zu nutzen und Oberflächen technologisch so zu modifizieren, dass definierte Reaktionen der Zellen ausgelöst werden können. Dafür stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung, biochemische Modifikationen, die direkt die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung ansprechen, oder topographische Veränderungen. Die interessante Frage, wie die intrazellulären Signalkaskaden von Oberflächenmodifikationen beeinflusst werden, ist überraschenderweise bis jetzt in der Literatur kaum diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch das Augenmerk auf der direkten Beeinflussung der Zellmigration und Zelladhäsion durch Oberflächeneigenschaften liegen. Dabei war besonders deren technische Verwertung im Hinblick auf eine effiziente Zellspurerzeugung zu berücksichtigen.

Biochemisch modifizierte Oberflächen sind relativ einfach herzustellen, beispielsweise durch die Beschichtung der Oberfläche mit Proteinen der ECM. Ihr Einfluss auf das Verhalten der Zelle ist bereits in einer Reihe von Arbeiten untersucht worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Modifikation des Substrats durchgeführt, um Einfluss auf die Zellspurbildung auszuüben. Die Strukturierung biochemisch modifizierter Oberflächen ist beispielsweise durch „Micro-Contact-Printing“ möglich. Dabei können die

Strukturparameter in weiten Bereichen variiert werden (Lehnert et al. 2004). Technisch wesentlich komplizierter ist die topographische Strukturierung von Oberflächen. Allerdings birgt dieser Ansatz einige wichtige Vorteile, so dass das Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf den topographischen Strukturen lag. Mithilfe topographischer Modifikation kann man einer Oberfläche beispielsweise relativ einfach einen Richtungssinn einprägen. Ein korrespondierender biochemischer Ansatz wäre nur mithilfe kompliziert zu erzeugender Gradienten möglich und ist technisch noch nicht ausgereift. Eine topographische Modifikation des Substrats eröffnet weiterhin einen praktikablen Zugang zum interessanten Größenbereich zwischen 100 Nanometern und 5 Mikrometern, der beim Aufbau der intrazellulären Strukturen eine wichtige Rolle spielt. Zudem bieten die Parameter topographischer Strukturen wie Höhe, Aspektverhältnis oder Materialkontrast ein breites Spektrum an experimentellen Variationsmöglichkeiten.

### **6.5.1 Veränderung der Zellspurmorphologie bei beschichteten Substraten**

Für die biotechnologische Nutzung von Zellspuren ist es wichtig, aktiv auf die Parameter Einfluss nehmen zu können, welche Qualität und Quantität der Zellspur bestimmen. Durch die biochemische Modifikation der Substratoberfläche mittels Fibronektin (FN-) Beschichtung konnte die Zellspurmorphologie verändert werden.

Bei der Adhäsion auf FN entsprachen die riefenförmigen Adhäsionsmuster der entsprechenden Zellen denen auf unbeschichteten Glassubstraten. Das Adhäsionsmuster von L929-Fibroblasten hingegen war jetzt nicht mehr punktförmig wie auf Glas, sondern bestand auf FN ebenfalls aus Riefen. Da ein Zusammenhang zwischen Adhäsionsmuster und der Organisation von Aktinzytoskelett und Zellspurmorphologie besteht, musste für beide ebenfalls mit Änderungen durch die Oberflächenmodifikation gerechnet werden. Diese Erwartungen konnten bestätigt werden. Das Aktin war nun ebenso parallel entlang der ventralen Zellmembran angeordnet wie in den anderen Zelltypen mit riefenförmigem Adhäsionsmuster (Abbildung 28). Die beobachteten Spuren verliefen dem entsprechend parallel und unverzweigt. (Abbildung 27).

Insgesamt hinterließen die L929-Fibroblasten auf FN zusätzlich deutlich mehr Spuren. Das könnte durch eine verstärkte Adhäsion erklärt werden, die durch eine Erhöhung der Ligandenanzahl im Substrat aufgrund der FN-Beschichtung verursacht wurde (Palecek et al. 1997). Zudem erscheint die Gesamtzelle im TIRF-Bild deutlich heller, was darauf zurückgeführt wird, dass sie sich näher am Substrat befindet. Die Tatsache, dass die Zellspurbildung auf einem physiologischen Substrat verstärkt wird, bestärkt die Annahme, dass es sich bei Zellspuren nicht um ein Artefakt der Zellkultur handelt.

Diese Befunde zeigen, dass unter dem Einsatz verschiedener Oberflächen die Morphologie von Zellspuren beeinflussbar ist. Zusätzlich sollte eine Verstärkung der Zell-Substrat-Haftung die Gesamtzahl der Spuren deutlich erhöhen. Allerdings ist dabei zu beachten, dass sich die Erhöhung der Zell-Substrat-Haftung negativ auf die

Migrationsgeschwindigkeit auswirkt (Palecek et al. 1997). Diese gegensätzlichen Auswirkungen der Hafteigenschaft von Oberflächen müssen bei der technischen Nutzung von Zellspuren für jeden Anwendungsfall optimiert werden. Im Hinblick auf eine spätere Kommerzialisierung können beispielsweise kurze Laufzeiten der Zellen wichtig werden. Die kontrollierte Ablage von größeren Mengen an Zellspuren wäre hingegen beispielsweise unter dem Ansatz einer weiterführenden Analytik interessant, da die Übereinstimmung der Oberflächenmarker von Zellspur und Zelle bisher nur exemplarisch gezeigt wurde (Zimmermann et al. 2001). „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC) oder andere chromatographische Analyseverfahren wie auch spektroskopische Methoden würden eine umfassende Untersuchung der genauen Zusammensetzung der Zellspuren ermöglichen. Ebenso ist zu klären, inwieweit sich Änderungen zellulärer Zustände wie z. B. Differenzierung oder Malignität auf die Zusammensetzung der Zellspur auswirken.

### **6.5.2 Einfluss topographisch strukturierter Oberflächen**

Die topographische Strukturierung von Oberflächen kann ebenfalls das Zellverhalten verändern. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Metallstrukturen (Gold oder Titan) auf Glassubstraten untersucht, deren Größe oberhalb der makromolekularen und unterhalb der zellulären Ebene gewählt wurde. Dieser Größenbereich ist besonders interessant, da sich in diesem wichtige Organisationsstrukturen der Zelle ausbilden. Beispiele hierfür aus dem Bereich der Zelladhäsion sind das „Integrinclustering“ im Nanometerbereich oder die Bildung von Adhäsionen im Bereich von einigen Mikrometern (Arnold et al. 2004; Zaidel-Bar et al. 2003; Zamir et al. 2000). In einem ersten Ansatz wurden zuerst verschiedene Motive von Strukturen auf ihren Einfluss auf das Zellverhalten untersucht. Eine Variation der Strukturparameter besonders wirksamer Muster ist technologisch aufwändig und bleibt weiterführenden Arbeiten vorbehalten.

Bei Experimenten mit den strukturierten Substraten in dieser Größenordnung ließ sich feststellen, dass die strukturierten Bereiche von den Zellen bevorzugt besiedelt wurden (Abbildung 29), obwohl die Glasoberfläche nicht passiviert war. Der Effekt ist also auf das Vorhandensein der Struktur zurückzuführen. Für diese gesteigerte Attraktivität könnte es neben der rein topographischen Veränderung weitere Erklärungen geben. Der chemische Kontrast, der dadurch zu Stande kommt, dass Metallstrukturen (Gold oder Titan) auf eine Glasoberfläche aufgebracht wurden, stellt dabei die wahrscheinlichste Lösung dar. In der Literatur gibt es Beispiele dafür, dass Ladungsunterschiede zwischen zwei Oberflächen Einfluss auf die Zellen ausüben können. Möglicherweise wird die weniger negativ geladene Oberfläche der Struktur von den Zellen bevorzugt (Healy 1994). Dieser Effekt kann sich an den Strukturkanten noch verstärken. Dort stoßen in einem sehr schmalen Bereich die beiden Oberflächen aufeinander.

Die Strukturhöhe ist im Vergleich zur Strukturbreite nur sehr gering. Umso erstaunlicher ist, dass die Zellen diese kleinen Unterschiede wahrnehmen und darauf reagieren.

Abbildung 36 zeigt das Aspektverhältnis der Strukturen und die Schärfe der Kanten maßstabsgetreu.

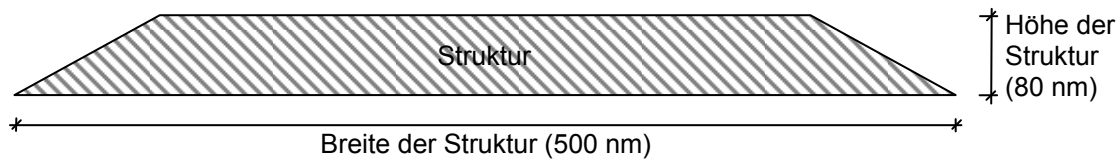


Abbildung 36: Maßstabsgetreue Darstellung des Aspektverhältnisses der Strukturen und der Steilheit der Kanten.

Bei der Adhäsion der Zellen auf den Strukturen konnte beobachtet werden, dass sich die Zellen an die vorgegebene Form anpassen. Dabei besaßen die Fibroblasten eine spindelförmige Morphologie auf den Linienstrukturen und eine trichterförmige auf den Strukturfeldern (Abbildung 29 A, C). Mit einer topographischen Strukturierung der Oberfläche im Maßstab einer Einzelzelle wurde bereits früher gezeigt, dass Veränderungen der Zellmorphologie möglich sind (Jungbauer et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch Strukturen im subzellulären Bereich solche Effekte auf Zellen ausüben können. Im Hinblick auf die geringe Höhe der hier verwendeten Strukturen ist diese Beobachtung sehr interessant. Die bevorzugte Adhäsion der Zellen auf den Strukturen könnte eventuell in Zukunft das gezielte Platzieren von Zellen vereinfachen.

Des Weiteren wurden Winkelstrukturen und eine radförmige Anordnung von Strukturpunkten auf ihren Einfluss getestet (Abbildung 30). Dabei konnten Veränderungen der Anordnung des Zytoskeletts der Zelle beobachtet werden. Mit Hilfe der Winkelstrukturen wurde das Aktinzytoskelett der Zellen durchgängig parallel ausgerichtet. Die Radstruktur führte zu einer kreisförmigen Ausrichtung der Zellen. Hier endete das Aktinzytoskelett vermehrt auf den Strukturen. Die gleichmäßige parallele Anordnung des Aktinzytoskeletts auf den Winkelstrukturen ist beachtlich. Bei den Winkelstrukturen handelt es sich um gerichtete Strukturen, die eine eindeutige Vorzugsrichtung aufweisen (Abbildung 9). Es ist zwar nicht eindeutig zu erkennen, ob diese Richtung von den Zellen erkannt worden ist, aber die Anordnung der Aktinfasern erfolgte entlang der Winkelpfeile. Offensichtlich hat die Symmetrie der Struktur Einfluss auf die Anordnung des Zytoskeletts der Zellen. In der Literatur ist die Reaktion von Zellen auf eine symmetrische Anordnung von adhäsiven Punkten aus FN auf einer Oberfläche beschrieben. Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Aktinzytoskelett zwischen den FN-Punkten aufgespannt war (Lehnert et al. 2004). Auf Grund der gleichmäßigen Anordnung der FN-Punkte wurde mit dieser Anordnung den Zellen allerdings keinerlei Symmetrie aufgeprägt.

Morphologische Änderungen bei Zellen können sich also bis in die Anordnung der Zytoskelettbestandteile fortpflanzen. Das konnte sowohl bei biochemisch modifizierten (Abbildung 28) als auch bei topographisch strukturierten Oberflächen (Abbildung 30)

beobachtet werden. Somit bleibt festzuhalten, dass sich die Veränderung der Substratoberflächen bis in das Grundgerüst der Zelle auswirken kann. Diese Erkenntnisse sind beispielsweise auch im Hinblick auf das „Tissue Engineering“ und das Feld der Implantationschirurgie interessant, bei denen die Interaktion der Zellen mit artifiziellen Oberflächen eine große Rolle spielt.

## **6.6 Bildung von Aktinsternen**

Bei den Untersuchungen der Dynamik des substratnahen Aktinzytoskeletts konnten in C2C12-Muskelzellen und L929-Fibroblasten spontan wolken- und ringförmige Aktinakkumulationen verschiedener Größen und Formen mit einer Lebensdauer von unter 15 Minuten beobachtet werden. Ein Teil dieser Akkumulationen kondensierte in L929-Zellen zu sternförmigen Aktinstrukturen. Die Größe der Aktinsterne entsprach dabei der Größe der vorherigen Aktinwolke und schwankte zwischen 5 und 20 Mikrometern. Die Aktinsterne bestanden aus einem Aktinzentrum und mehreren sternförmig angeordneten Strahlen und waren unterschiedlich lang stabil.

Zur Bildung von Aktinsternen aus Aktinwolken muss G-Aktin unter Energieaufwendung zu Fasern polymerisiert werden. Da schwer vorstellbar ist, dass sich ein zweckloser Energieverbrauchender Prozess evolutionär durchsetzen kann, muss man davon ausgehen, dass Aktinsterne eine physiologische Bedeutung haben. Dabei ist interessant, dass nicht jede Wolke zu einem Stern umgeformt wird.

Auf Grund der Tatsache, dass die Akkumulation des Aktins zu Wolken innerhalb von 15 Minuten geschah, kommt für diesen Prozess keine Neusynthese von Aktin in Frage. Zusätzlich spricht auch die Verarmung der Umgebung an Aktin (Abbildung 31) dafür, dass es sich um einen akkumulatorischen Prozess handelt. Wie dieser Prozess allerdings gesteuert wird, war im Rahmen dieser Arbeit nicht zu klären. Ähnliche Fragen wirft auch die Kondensation der Wolke zum Stern auf. Bei der Bildung des ersten Sterns (Abbildung 31) bildete sich eine Ringstruktur aus, die dann immer kleiner wurde und das Zentrum des Sternes bildete. Bei der Bildung des zweiten Sterns wurde keine Ringstruktur mehr beobachtet, sondern das Aktin war gleich im Zentrum der Wolke lokalisiert (Abbildung 32). Bei der Auswertung dieser Aufnahmen muss man beachten, dass mittels der TIRF-Mikroskopie nur ein schmaler substratnaher Bereich betrachtet wird. Daher könnte die beobachtete Helligkeitszunahme grundsätzlich auch auf ein Artefakt zurückgeführt werden. Wenn sich beispielsweise die Zellmembran absenken und dem Substrat nähern würde, würde die Intensität ebenfalls zunehmen. Denkbar wäre z. B. die Bildung eines Adhäsionskomplexes, der dann die Membran nach unten an das Substrat zöge. Das würde allerdings in der Konsequenz bedeuten, dass die beobachteten Aktinfasern sternförmig in einem Adhäsionskomplex endeten. Eine solche Struktur ist bisher noch nicht beschrieben worden. Zusätzlich müssten bei der sich verkleinernden Ringstruktur in Abbildung 31 die Adhäsionen aufeinander zuwandern. Dagegen beruhen

die in der Literatur beschriebenen Wanderungsprozesse von Adhäsionskomplexen auf der Aktomyosin-Kontraktion und müssten die Adhäsionen auseinander ziehen (Zamir et al. 2000).

In Abbildung 31 wurde außerdem gezeigt, wie ein gebildeter Stern langsam wieder verschwand. Dieser Prozess kann entweder dadurch verursacht werden, dass die Struktur sich auflöst oder den mit TIRF anregbaren Bereich verlässt. Der Stern könnte sich planar und gleichmäßig parallel nach oben bewegen, beispielsweise verursacht durch eine in höheren Ebenen der Zelle gelegen Struktur. Dafür müsste allerdings der Stern gleichmäßig dunkler werden. Da einzelne Fasern beobachtet werden konnten, die verkürzt wurden oder direkt verschwanden ist dies nicht der Fall. Auf Grund der geringen Anregungstiefe würde der Aktinnstern auch homogen dunkler werden, wenn der Stern asymmetrisch das TIRF-Feld verlassen würde. Somit kann man davon ausgehen, dass der Aktinstern abgebaut wird. Es bleibt zu bedenken, dass keine Aussagen darüber gemacht werden können, ob es in höheren Bereichen der Zelle Strukturen gibt, die mit der Bildung von Aktinwolken oder Sternen im Zusammenhang stehen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Sterne bis zu 7 Stunden stabil sein konnten, auch wenn die eigentlichen Raten des Aktin „turn-over“ in den Fasern im Minutenmaßstab liegen (Wang 1985). In diesem Zusammenhang kann die Beobachtung von Bedeutung sein, dass sich die Sterne aufeinander zu (Abbildung 33) oder in Richtung der Membran (Abbildung 32) durch das Zytosol der Zelle bewegten. Da dort offensichtlich Kräfte wirken liegt die Überlegung nahe, dass die Funktion der Sterne etwas mit Kraftübertragung zu tun hat. Durch die radiale Anordnung der Fasern wäre eine Art Drehkreuzfunktion denkbar, mit der Kräfte in andere Richtungen als nur linear weiter- bzw. umgeleitet werden könnten.

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Aktinsterne mit bereits beschriebenen sternförmigen Aktinstrukturen lässt auch keine Schlüsse auf die Bedeutung der Aktinsterne zu. Deutliche kleinere Aktinsterne wurden im Bereich zwischen Lamellipodium und Kern von Zellen beschrieben (Small 1998). Allerdings wurde diesen Strukturen keine weitere Bedeutung zugemessen. Eine größere sternförmige Aktinstruktur entsteht nach der Stimulierung von MDCK-Zellen mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (Imamura et al. 1998). Diese Sterne ähneln denen, die im Rahmen dieser Arbeit in migrierenden Fibroblasten beobachtet wurden (Abbildung 11). Im Bereich des Kerns befindet sich eine sternförmige Aktinstruktur, deren Strahlen bei migrierenden Zellen leicht in Richtung der Zellfront reichen. Allerdings handelt es sich bei der in der Literatur beschriebenen Beobachtung um ein stimuliertes System, bei dem die sternförmige Anordnung nicht spontan auftrat und die daher als reine Reaktion der Zelle angesehen werden muss. In der vorliegenden Arbeit hingegen trat die Bildung von Aktinsternen immer spontan auf und ist daher dem physiologischen Verhalten der Zelle zuzuordnen. Interessanter ist hingegen die Beobachtung, dass in In-vitro-Kultursystemen mit zytosolischen Extrakten unter Bedingungen, die die Filopodienbildung begünstigen,

ebenfalls sternförmige Aktinstrukturen entstehen (Vignjevic et al. 2003). Allerdings waren die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Aktinsterne nicht in der Zellperipherie lokalisiert und konnten aufeinander zu wandern. Diese Beobachtungen lassen eher auf Stressfasern, als auf eine Filopodien-ähnliche Struktur schließen (Abbildung 33).

Wolkenförmige Aktinakkumulationen sind bisher noch nicht beschrieben worden. Allerdings wurden bereits konzentrisch wachsende Aktinringe beobachtet, die ebenfalls als Aktinwolken bezeichnet wurden (Ballestrem et al. 1998). Die dort gefundenen Strukturen ähneln den Ringen, die in der vorliegenden Arbeit in C2C12-Muskelzellen beobachtet wurden. Es fällt auf, dass in beiden Fällen das Aktin leicht granulär erscheint, was diese Akkumulationen von den in L929-Zellen gefundenen Strukturen unterscheidet. Es bleibt also festzuhalten, dass die hier gefundenen wolken- und sternförmigen Aktinstrukturen mit keiner der in der Literatur beschriebenen Strukturen identisch sind und es sich um bisher noch nicht beobachtete Phänomene handelt.

## 7 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen und die damit verknüpfte Entstehung der Zellspur werden zukünftig in die Entwicklung einer Analyseplattform, dem "Zellspur-Chip", zur biotechnologischen Nutzung von Zellspuren eingehen. Es konnte gezeigt werden, wie die Zellspurmorphologie durch eine biochemisch veränderte Oberfläche beeinflusst werden kann. Dieser Ansatz wird weiterhin verfolgt werden, um die Generation von Zellspuren in Menge und Morphologie kontrollieren zu können.

Für die Verwirklichung des Zellspur-Chips muss die Kontrolle der Zellmigration verbessert werden, um die Ablage von Zellspuren ortsgenau bestimmen zu können. Denkbar wäre beispielsweise die Beeinflussung durch Gradienten von chemotaktisch aktiven Substanzen, die gelöst im mikrofluidischen System zugeführt werden oder auf der Substratoberfläche aufgebracht werden könnten. Dazu kann beispielsweise das Verfahren des Nanospottings angewendet werden. Ist die Zelle so, nach Ablage einer Zellspur, auf dem Zielsubstrat angekommen, wird sie von ihrer Spur getrennt. Dazu kommt neben der mechanischen Separation auch der Einsatz von thermisch schaltbaren Oberflächen in Frage. Eine kleine Temperaturveränderung kann hier zur kompletten Abstoßung der vorher adhärenen Zelle führen, ohne messbare Schädigungen hervor zu rufen. Solche Polymer-Oberflächen werden derzeit bereits in der Arbeitsgruppe entwickelt.

Die Übereinstimmung der Oberflächenmarker von Zellspur und Zelle ist bisher nur exemplarisch gezeigt worden. Will man die Zellspur wie geplant stellvertretend für die Zelle analysieren, ist es essenziell wichtig, Sicherheit durch größere Datenmengen zu erhalten. Eine Analyse mittels hochempfindlicher Massenspektrometrie würde sich hier beispielsweise anbieten, da ja nur wenig Probenmaterial zur Verfügung steht. Gelänge es, Zellspuren in größeren Mengen herzustellen, könnte man sowohl die Proteine als auch die Lipide aus der Membran aufreinigen und getrennt analysieren. Damit wären diverse analytische Methoden wie beispielsweise zweidimensionale Gelelektrophorese, HPLC oder andere chromatographische und spektroskopische Analyseverfahren einsetzbar.

Die ersten Ergebnisse zur Beeinflussung von Zelladhäsion und Zellmigration konnten auch mit den topographisch strukturierten Oberflächen erzielt werden. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die Gründe für die erzielten Effekte näher zu untersuchen, um die Effektivität des Einflusses auf die Zellen erhöhen und noch exakter steuern zu können. Dabei könnten sowohl die Gold- als auch die Glasoberfläche weiter modifiziert werden. Beispiele hierfür sind die Koppelung eines Adhäsionspeptids wie RGD an die Strukturen oder eine Passivierung der Glasoberfläche zur Verminderung der Adhäsion zwischen den Strukturen. Um den Einfluss der Topographie des Substrats analysieren zu können, müssen Strukturparameter wie Länge, Breite und Höhe im gewählten



Größenbereich variiert werden. Auch Anordnung und Muster der Strukturen können weiter optimiert werden, um den Einfluss auf Zellen zu optimieren.

Die Erforschung der Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen hat auch für die medizinische Forschung großes Potenzial. Beispielsweise für die Optimierung von Implantationsmaterialien oder auch im Bereich des „Tissue Engineering“ stellt die direkte Interaktion der Zelle mit der Oberfläche einen wichtigen Parameter für das Zellverhalten dar. Dabei können sowohl die Chemie der Oberfläche, als auch ihre Topographie eine wichtige Rolle spielen. Einflüsse, die durch die Strukturierung der Oberfläche entstehen, sind erst unvollständig verstanden. Dies muss aber weiter verfolgt werden, damit die Bedingungen der In-vitro-Kultur mehr und mehr den physiologischen Gegebenheiten angepasst werden können. Dies wird langfristig für den Aufbau von Geweben in In-vitro-Kultur eine Voraussetzung sein.

## 8 Literatur

- Abercrombie M, Dunn GA. 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res* 92(1):57-62.
- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. 1970a. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* 59(3):393-8.
- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. 1970b. The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res* 60(3):437-44.
- Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. 1971. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* 67(2):359-67.
- Abrams GA, Goodman SL, Nealy PF, Franco M, Murphy CJ. 2000. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the resus macaque. *Cell Tissue Res* 299: 39-46
- Alahari SK, Reddig PJ, Juliano RL. 2002. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol* 220:145-84.
- Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blummel J, Eck W, Kantelehnner M, Kessler H, Spatz JP. 2004. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem* 5(3):383-8.
- Artemov D, Pilatus U, Chu S, Mori N, Nelson JB, Bhujwala ZM. 1999. Dynamics of prostate cancer cell invasion studied in vitro by NMR microscopy. *Magn Reson Med* 42(2):277-82
- Axelrod D. 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* 89(1):141-5.
- Axelrod D. 2001. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2(11):764-74.
- Ballestrem C, Hinz B, Imhof BA, Wehrle-Haller B. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential  $\alpha$ V $\beta$ 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol* 155(7):1319-32.
- Ballestrem C, Wehrle-Haller B, Imhof BA. 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 12):1649-58.
- Bamburg JR. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:185-230.
- Bar-Ziv R, Moses E. 1994. Instability and "pearling" states produced in tubular membranes by competition of curvature and tension. *Physical Review Letters* 73(10):1392-1395.
- Bar-Ziv R, Tlusty T, Moses E, Safran SA, Bershadsky A. 1999. Pearling in cells: a clue to understanding cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18):10140-5.
- Bard JB, Hay ED. 1975. The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *J Cell Biol* 67(2PT.1):400-18.
- Baumann W, Lehmann M, Schwinde A, Ehret R, Brischwein M, Wolf B. 1999. Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. *Sensors & Actuators B* 55:77-89
- Beckerle MC, Burridge K, DeMartino GN, Croall DE. 1987. Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* 51(4):569-77.
- Beningo KA, Dembo M, Kaverina I, Small JV, Wang YL. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol* 153(4):881-8.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7):517-29.

- Bevis BJ, Glick BS. 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20(1):83-7.
- Blanchoin L, Pollard TD. 1998. Interaction of actin monomers with *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J Biol Chem* 273(39):25106-11.
- Blanchoin L, Pollard TD, Mullins RD. 2000. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* 10(20):1273-82.
- Brakebusch C, Hirsch E, Potocnik A, Fassler R. 1997. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci* 110 (Pt 23):2895-904.
- Brischwein M, Motrescu ER, Cabala E, Otto AM, Grothe H, Wolf B. 2003. Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips. *Lab on A Chip* 3(4):234-40.
- Carlier MF, Pantaloni D. 1997. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* 269(4):459-67.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science* 276(5317):1425-8.
- Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 270(28):16995-9.
- Chen WT. 1981a. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol* 90(1):187-200.
- Chen WT. 1981b. Surface changes during retraction-induced spreading of fibroblasts. *J Cell Sci* 49:1-13.
- Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133(6):1403-15.
- Condeelis J. 1993. Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 9:411-44.
- Cooray P, Yuan Y, Schoenwaelder SM, Mitchell CA, Salem HH, Jackson SP. 1996. Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem J* 318 (Pt 1):41-7.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No):33-8.
- Cox EA, Huttenlocher A. 1998. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech* 43(5):412-9.
- Cramer LP. 1997. Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells. *Front Biosci* 2:d260-70.
- Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol* 136(6):1287-305.
- Crowley E, Horwitz AF. 1995. Tyrosine phosphorylation and cytoskeletal tension regulate the release of fibroblast adhesions. *J Cell Biol* 131(2):525-37.
- Darribere T, Skalski M, Cousin HL, Gaultier A, Montmory C, Alfandari D. 2000. Integrins: regulators of embryogenesis. *Biol Cell* 92(1):5-25.
- Dembo M, Wang YL. 1999. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* 76(4):2307-16.
- DiMilla PA, Barbee K, Lauffenburger DA. 1991. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J* 60(1):15-37.
- DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol* 122(3):729-37.
- Djabali K. 1999. Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. *Histol Histopathol* 14(2):501-9.

- Dolezel J, Sgorbati S, KLucretti S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85(4):625-631.
- Doolittle KW, Reddy I, McNally JG. 1995. 3D analysis of cell movement during normal and myosin-II-null cell morphogenesis in dictyostelium. *Dev Biol* 167(1):118-29.
- Duschl C, Lankenau A. 2005. Nutzung lebender Zellen zur Erzeugung natürlicher und künstlicher Nanofilamente. Abschlussbericht eines Förderprojektes des Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Förderkennzeichen 0312000B
- Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Wolf B. 1998. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Medical & Biological Engineering & Computing* 36:365-70
- Esposito BP, Epsztejn S, Breuer W, Cabantchik ZI. 2002. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal Biochem* 304(1):1-18.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7413-7.
- Friedl P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16(1):14-23.
- Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3(5):362-74.
- Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 43(5):369-78.
- Fuhr G, Richter E, Zimmermann H, Hitzler H, Niehus H, Hagedorn R. 1998. Cell traces--footprints of individual cells during locomotion and adhesion. *Biol Chem* 379(8-9):1161-73.
- Földes-Papp Z, Demel U, Tilz GP. 2003. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *international Immunopharmacology* 3:1715-1729.
- Geggier P, Fuhr G. 1999. A time-resolved total internal reflection aqueous fluorescence (TIRAF) microscope for the investigation of cell adhesion dynamics. *Appl. Phys. A* 68:505-513.
- Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11):793-805.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285(5430):1028-32.
- Glading A, Lauffenburger DA, Wells A. 2002. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol* 12(1):46-54.
- Grande-Garcia A, Echarri A, Del Pozo MA. 2005. Integrin regulation of membrane domain trafficking and Rac targeting. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4):609-13.
- Grossmann J. 2002. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7(3):247-60.
- Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3):345-57.
- Hall A. 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5):891-5.
- Healy KE, Iom, B., Hockberger, P.E. 1994. Spatial Distribution of Mammalian Cells Dictated by Material Surface Chemistry. *Biotechnol. Bioeng.* 43:792-800.
- Homolya L, Hollo Z, Germann UA, Pastan I, Gottesman MM, Sarkadi B. 1993. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* 268(29):21493-6.

- Hornung J, Fuhr G. 1996. Influence of Polylysine on Adhesion of Fibroblasts on Glass Substrates visualised by Total Internal Reflection Microscopy (TIRM). *Experimental Biology Online* 1(10):1-11.
- Hornung J, Müller T, Fuhr G. 1996. Cryopreservation of Anchorage-Dependent Mammalian Cells Fixed to structured Glass and silicon Substrates. *Cyobiology* 33:260-270.
- Hug C, Jay PY, Reddy I, McNally JG, Bridgman PC, Elson EL, Cooper JA. 1995. Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium. *Cell* 81(4):591-600.
- Huttenlocher A, Ginsberg MH, Horwitz AF. 1996. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol* 134(6):1551-62.
- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. 1995. Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 7(5):697-706.
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11-25.
- Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6):673-87.
- Hynes RO. 2003. Structural biology. Changing partners. *Science* 300(5620):755-6.
- Imamura H, Takaishi K, Nakano K, Kodama A, Oishi H, Shiozaki H, Monden M, Sasaki T, Takai Y. 1998. Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells. *Mol Biol Cell* 9(9):2561-75.
- Izzard CS, Lochner LR. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci* 21(1):129-59.
- Izzard CS, Lochner LR. 1980. Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J Cell Sci* 42:81-116.
- Jaasma MJ, Jackson WM, Keaveny TM. 2006. Measurement and characterization of whole cell mechanical behaviour. *Ann Biomed Eng.* 34(5):748-58 : AFM
- Jones NC, Trainor PA. 2005. Role of morphogens in neural crest cell determination. *J Neurobiol* 64(4):388-404.
- Jungbauer S, Kemkemer R, Gruler H, Kaufmann D, Spatz JP. 2004. Cell shape normalization, dendrite orientation, and melanin production of normal and genetically altered (haploinsufficient NF1)-melanocytes by microstructured substrate interactions *Chemphyschem* 5(1): 85-92
- Keller R. 2005. Cell migration during gastrulation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):533-41.
- Kirfel G, Rigort A, Borm B, Schulte C, Herzog V. 2003. Structural and compositional analysis of the keratinocyte migration track. *Cell Motil Cytoskeleton* 55(1):1-13.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137(2):481-92.
- Lanni F, Waggoner AS, Taylor DL. 1985. Structural organization of interphase 3T3-fibroblasts studied by total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 100(4):1091-102.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359-69.
- Lee J, Ishihara A, Theriot JA, Jacobson K. 1993. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature* 362(6416):167-71.
- Lehnert D, Wehrle-Haller B, David C, Weiland U, Ballestrem C, Imhof BA, Bastmeyer M. 2004. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci* 117(Pt 1):41-52.
- Liliensiek SJ, Campbell S, Nealy PF, Murphy CJ. 2006. The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*, online

- Liminga G, Jonsson B, Nygren P, Larsson R. 1999. On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol* 383(3):321-9.
- Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* 79(1):144-52.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6(12):1182-90.
- Martin P, Leibovich SJ. 2005. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15(11):599-607.
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17(10):969-73.
- Mayer C, Maaser K, Daryab N, Zanker KS, Brocker EB, Friedl P. 2004. Release of cell fragments by invading melanoma cells. *Eur J Cell Biol* 83(11-12):709-15.
- Minsky M; 1957 Dec. 19,1961. Microscopy apparatus patent 3,013,467.
- Misteli T, Spector DL. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* 15(10):961-4.
- Mitchison TJ, Cramer LP. 1996. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84(3):371-9.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):56-68.
- Mogilner A, Oster G. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* 71(6):3030-45.
- Molyneaux K, Wylie C. 2004. Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48(5-6):537-44.
- Montero JA, Heisenberg CP. 2004. Gastrulation dynamics: cells move into focus. *Trends Cell Biol* 14(11):620-7.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11):6181-6.
- Munevar S, Wang Y, Dembo M. 2001a. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3-fibroblasts. *Biophys J* 80(4):1744-57.
- Munevar S, Wang YL, Dembo M. 2001b. Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration. *Mol Biol Cell* 12(12):3947-54.
- Munevar S, Wang YL, Dembo M. 2004. Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated  $Ca^{2+}$  entry. *J Cell Sci* 117(Pt 1):85-92.
- Otterbein LR, Graceffa P, Dominguez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293(5530):708-11.
- Palecek SP, Horwitz AF, Lauffenburger DA. 1999. Kinetic model for integrin-mediated adhesion release during cell migration. *Ann Biomed Eng* 27(2):219-35.
- Palecek SP, Huttenlocher A, Horwitz AF, Lauffenburger DA. 1998. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 7):929-40.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385(6616):537-40.
- Pankov R, Cukierman E, Katz BZ, Matsumoto K, Lin DC, Lin S, Hahn C, Yamada KM. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* 148(5):1075-90.
- Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P, Carlier MF. 2000. The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* 2(7):385-91.
- Parsons JT. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116(Pt 8):1409-16.

- Prechtel K, Bausch AR, Marchi-Artzner V, Kantlehner M, Kessler H, Merkel R. Dynamic force spectroscopy to probe adhesion strength of living cells. *Phys Rev Let* 89(2):028101
- Raucher D, Sheetz MP. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* 148(1):127-36.
- Reddig PJ, Juliano RL. 2005. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24(3):425-39.
- Richter E, Hitzler H, Zimmermann H, Hagedorn R, Fuhr G. 2000. Trace formation during locomotion of L929-mouse fibroblasts continuously recorded by interference reflection microscopy (IRM). *Cell Motil Cytoskeleton* 47(1):38-47.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704-9.
- Rigort A, Grunewald J, Herzog V, Kirfel G. 2004. Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration. *Eur J Cell Biol* 83(11-12):725-33.
- Santoro MM, Gaudino G. 2005. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 304(1):274-86.
- Schafer DA, Cooper JA. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:497-518.
- Schaller MD, Parsons JT. 1995. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* 15(5):2635-45.
- Schwartz MA, Assoian RK. 2001. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114(Pt 14):2553-60.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. 1995. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:549-99.
- Sheetz MP. 1994. Cell migration by graded attachment to substrates and contraction. *Semin Cell Biol* 5(3):149-55.
- Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG. 1998. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* 8(2):51-4.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59:223-39.
- Sjaastad MD, Nelson WJ. 1997. Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays* 19(1):47-55.
- Small JV. 1981. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J Cell Biol* 91(3 Pt 1):695-705.
- Small JV. 1988. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev* 1(1):155-74.
- Small JV, Geiger B, Kaverina I, Bershadsky A. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):957-64.
- Small JV, Isenberg G, Celis JE. 1978. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature* 272(5654):638-9.
- Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1404(3):271-81.
- Smilenov LB, Mikhailov A, Pelham RJ, Marcantonio EE, Gundersen GG. 1999. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 286(5442):1172-4.
- Steyer JA, Almers W. 2001. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):268-75.
- Stoker AW. 2005. Protein tyrosine phosphatases and signalling. *J Endocrinol* 185(1):19-33.

- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160(3):409-21.
- Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302(5642):103-6.
- Takeichi M, Hatta K, Nose A, Nagafuchi A. 1988. Identification of a gene family of cadherin cell adhesion molecules. *Cell Differ Dev* 25 Suppl:91-4.
- Takeichi M, Nakagawa S, Aono S, Usui T, Uemura T. 2000. Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355(1399):885-90.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. 1998. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280(5369):1614-7.
- Tan J, Saltzman WM. 2002. Topographical control of human neutrophil motility on micropatterned materials with various surface chemistry. *Biomaterials* 23(15):3215-25.
- Toomre D, Manstein DJ. 2001. Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol* 11(7):298-303.
- Turner CE, Miller JT. 1994. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1583-91.
- van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3):285-98.
- Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, Peloquin J, Svitekina T, Borisy GG. 2003. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol* 160(6):951-62.
- Wang LH. 2004. Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med* 71(6):361-7.
- Wang YL. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* 101(2):597-602.
- Wear MA, Cooper JA. 2004. Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem Sci* 29(8):418-28.
- Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4(4):E97-100.
- Wehrle-Haller B, Imhof B. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol* 12(8):382-9.
- Wessels D, Vawter-Hugart H, Murray J, Soll DR. 1994. Three-dimensional dynamics of pseudopod formation and the regulation of turning during the motility cycle of *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton* 27(1):1-12.
- Westphal I, Clausen-Schaumann H, Joos U, Kriegsmann J, Pilarczyk G, Duschl C. 2004. Investigation of Cell Traces by Simultaneous Atomic-Force and Immunofluorescence Microscopy. 38. Jahrestagung BMT 2004.
- Wezeman FH. 1998. Morphological foundations of precartilag development in mesenchym. *Microsc. Res Tech.* 43(2): 91-101
- Wilson AK, Gorgas G, Claypool WD, de Lanerolle P. 1991. An increase or a decrease in myosin II phosphorylation inhibits macrophage motility. *J Cell Biol* 114(2):277-83.
- Woodrum DT, Rich SA, Pollard TD. 1975. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *J Cell Biol* 67(1):231-7.
- Wulf E, Deboen A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland T. 1979. Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4498-502.
- Yamada KM, Geiger B. 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9(1):76-85.



- Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F. 1998. Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9(5):993-1006.
- Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116(Pt 22):4605-13.
- Zamir E, Geiger B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114(Pt 20):3583-90.
- Zamir E, Katz M, Posen Y, Erez N, Yamada KM, Katz BZ, Lin S, Lin DC, Bershadsky A, Kam Z and others. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2(4):191-6.
- Zimmermann H, Hagedorn R, Richter E, Fuhr G. 1999. Topography of cell traces studied by atomic force microscopy. *Eur Biophys J* 28(6):516-25.
- Zimmermann H, Richter E, Reichle C, Westphal I, Geggier P, Rehn U, Rogaschewski S, Bleiß W, Fuhr GR. 2001. Mammalian cell traces- morphology, molecular composition, artificial guidance and biotechnological relevance as a new type of "bionanotube". *Applied Physics A* 73:11-26.

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADF	Aktin Depolymerisationsfaktor
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
Arp	“Actin-related” Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bandpass
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CLS	“Confocal Laser Scanning”
CP	“capping” Protein
Cy2	Carbocyanin
DAPI	4',6- Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
ddH <sub>2</sub> O	Millipore Wasser, doppelt destilliert
DsRed	<i>Discosoma</i> Rot fluoreszierendes Protein
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermis Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ERK	“Extracellular signal-regulated” Kinase
et al.	et alii
FA	Fokale Adhäsion
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FC	Fokaler Komplex
F-Aktin	filamentöses Aktin
FiA	fibrilläre Adhäsion
FKS	Fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GEF	Guanosin “Exchange Factor”
Grb2	“Growth factor receptor-bound protein 2”
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
h	Stunde(n)
HFT	Hauptfarbteiler
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
ILK	„Integrin-linked Kinase“
IR	Interferenz-Reflexion
Kan	Kanamycin
l	Liter
LP	Langpass
m	Mili (10 <sup>-3</sup> )
M	Molar (mol/ Liter)
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
MAPK	Mitogen aktivierten Protein Kinase
min	Minute(n)

---

MLC	Myosin-Leichte-Kette
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
NA	Numerische Apertur
NFT	NFT
PBS	Phosphat buffered saline
PDMS	Polydimethylsiloxane
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PLC	Phospholipase C
PTB	Phosphotyrosinbindende Domäne
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
RC	Relief Kontrast
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROCK	Rho-Kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SH2	Src Homologie Domäne 2
Src	Rous Sarcoma Virus
t	Zeitpunkt
TIRF	Totale Interne Reflektions Fluoreszenz
VASP	Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein
VCAM	Vaskuläres Zell Adhäsions Molekül

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter R. Fuhr, der mir diese interessante Fragestellung an der wichtigen Schnittstelle zwischen akademischer Forschung und biotechnologischer Anwendung zur Bearbeitung übertragen hat.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Claus Duschl. Seine konstruktiven und kritischen Anmerkungen, seine Nachfragen und Hinweise waren für mich fruchtbare Denkanstöße und mir dadurch eine große Hilfe.

Herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Andreas Lankenau, meinem Arbeitsgruppenleiter und inhaltlichem Betreuer dieser Arbeit. Mit seinen Ideen war er mir stets ein fachkundiger Ansprechpartner, der es immer wieder schaffte, mich auch nach Rückschlägen neu zu motivieren und anzuspornen.

Darüber hinaus gilt mein Dank der Arbeitsgruppe „Zell-Assay-Entwicklung“, die mich freundschaftlich in ihrer Mitte integriert und über die letzten Jahre begleitet hat. Besonderer Dank gilt Frau Beate Morgenstern, ohne deren Einsatz unsere Zellkultur nicht so reibungslos funktionieren würde.

Bei Herrn Dr. Götz Pilarczyk bedanke ich mich für die Einführung in die hochauflösende Mikroskopie. Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Hauke Kahl. Er stand mir in allen mikroskopischen Fragestellungen und bei jedem auftretenden technischen Problem als kompetenter Ansprechpartner schnell und unkompliziert zur Verfügung.

Auch bei Herrn Till Biskup möchte ich mich herzlich bedanken. Er hat meine Arbeit bei der rechnergestützten Auswertung der Zeitrafferaufnahmen durch ein Automatisierungsprogramm deutlich erleichtert und mir dadurch viele Stunden Handarbeit abgenommen.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Mann Carsten für seine uneingeschränkte Unterstützung, sowie allen anderen, die in der einen oder anderen Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines BMBF-Projektes („Bionanotubes“) und eines EU-Projektes (IP-„CellPROM“) anteilig gefördert.

---

## Selbständigkeitserklärung

Gemäß §6(3) der Promotionsordnung versichere ich, die Dissertation auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen selbständig erarbeitet und verfasst zu haben.

## Lebenslauf

Name:	Uta Joos, geb. Euler
Geburtsdatum:	30. November 1977
1984-1988	Grundschule: kath. Grundschule St.-Andreas Essen-Rüttenscheid
1988-1997	Gymnasium: B.M.V.-Schule Essen-Holsterhausen, Abschluss: Abitur
10/1997 – 11/2002	Studium der Biochemie an der Universität Hannover
07/1999	Abschluss des Grundstudiums: Vordiplomprüfungen
02/2002	Abschluss des Hauptstudiums: Diplomprüfungen
02/2002 - 11/2002	Diplomarbeit am Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch
11/2002 - 12/2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch
seit 02/2003	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer IBMT, Berlin
23.05.2005	Beginn der Promotionsarbeit

---

## Publikationsliste

### Beiträge für Zeitschriften

„Investigation of cell adhesion on structured surfaces using TIRF and CLS microscopy”

**U. Joos**, T. Biskup, O. Ernst, I. Westphal, C. Gherasim, R. Schmidt, K. Edinger,  
G. Pilarczyk, C. Duschl

European Journal for Cell Biology, 85 (3-4), March 2006, special issue

„Laser-free TIRF microscopy in cell biology”

G. Pilarczyk, **U. Joos**, T. Biskup, O. Ernst, I. Westphal, H. Kahl

Bio Tech, International, February/March 2006, Vol. 18 No 1

Applikationsbericht

„Laserfreie TIRF Mikroskopie in der Zellbiologie“

G. Pilarczyk, **U. Joos**, T. Biskup, O. Ernst, I. Westphal, H. Kahl

Bioforum, 28. Jahrgang 4, April 2005

Applikationsbericht

„Evanescent Field Microscopy: TIRF Microscopy”

G. Pilarczyk, **U. Joos**, I. Westphal, H. Kahl

Imaging and Microscopy, Research Development Production, Vol. 6; June 2004, p. 30-31,

GIT Verlag, Darmstadt

Applikationsbericht

„Mikroskopieren im Evaneszenten Feld: Die TIRF Mikroskopie ermöglicht neue Einsichten  
in lebende Kulturzellen“

G. Pilarczyk, **U. Joos**, I. Westphal, H. Kahl

Biospektrum, Nr. 2, 2004, 10. Jahrgang, p. 205-206, Spektrum Akademischer Verlag,

Elsevier GmbH, Heidelberg

Applikationsbericht

„Formation of star-shaped actin structures in living cells”

**U. Joos**, O. Ernst, T. Biskup, G. Pilarczyk, A. Lankenau, C. Duschl

In Vorbereitung

### Konferenzbeiträge (Vorträge und Poster)

„Fibroblast adhesion on structured surfaces using TIRF and confocal microscopy”

**U. Joos**, T. Biskup, O. Ernst, I. Westphal, C. Gherasim, R. Schmidt, K. Edinger,

G. Pilarczyk, C. Duschl

Adhesion Meeting 2005, Biology Department II, LMU, München, 28. - 30. April 2005

Vortrag und Poster

„Adhesion Patterns of Migrating and Sessile Cells Viewed with TIRF Microscopy”

**U. Joos**, J. Kriegsmann, T. Biskup, O. Ernst, I. Westphal, R. Schmidt, H. Kahl,

G. Pilarczyk, C. Duschl

2nd International DFG Symposium: Cell Migration in Development and Disease,

Universität Karlsruhe, 10.-13. Oktober 2004

Vortrag

---

Investigation of Cell Traces by Simultaneous Atomic Force and TIRF Microscopy  
I. Westphal, H. Clausen-Schaumann, **U. Joos**, J. Kriegsmann, B. Morgenstern, G. Pilarczyk, C. Duschl  
2nd International DFG Symposium: Cell Migration in Development and Disease,  
Universität Karlsruhe  
10. - 13. Oktober 2004  
Poster

„Investigation of Focal Adhesion Patterns of Migrating, Contractive and Sessile cells by TIRF Microscopy”  
**U. Joos**, J. Kriegsmann, I. Westphal, G. Pilarczyk, C. Duschl  
38. DGBMT Jahrestagung BMT 2004, Universität Ilmenau, 22.-24. September 2004  
Vortrag und Symposial-Publikation

Chemically Modified Glass Surfaces for the Growth of Culture Cells Examined by Light Microscopy  
T. Biskup, **U. Joos**, J. Kriegsmann, C. Heise, I. Westphal, G. Pilarczyk, C. Duschl  
Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster  
19.-22. September 2004  
Poster

„TIRF Microscopy: Adherent Cells in the Evanescent Field”  
**U. Joos**, O. Ernst, T. Biskup, J. Kriegsmann, I. Westphal, G. Pilarczyk  
Berliner Tage der Mikroskopie und Digitalen Bildverarbeitung, Olympus Deutschland Berlin,  
07. - 09. September 2004  
eingeladener Vortrag

„Geometric Properties of Cellular Adhesion Patterns”  
**U. Joos**, I. Westphal, R. Schmidt, K. Edinger, G. Pilarczyk, C. Duschl  
16th Heidelberg Cytometry Symposium, DKFZ Heidelberg, 16.-18. Oktober 2003  
Poster (Posterpreis)